

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局  
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C07H 15/252, A61K 31/70</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO97/12895</b>  <b>(43) 国際公開日</b> <b>1997年4月10日(10.04.97)</b>
<b>(21) 国際出願番号</b> .PCT/JP96/02789 <b>(22) 国際出願日</b> 1996年9月26日(26.09.96)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平7/253404 1995年9月29日(29.09.95) JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 科学技術振興事業団(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION)[JP/JP] 〒332 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama, (JP) 日本化薬株式会社(NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISYA)[JP/JP] 〒102 東京都千代田区富士見一丁目11番2号 Tokyo, (JP) <b>(71) 出願人: および</b> <b>(72) 発明者</b> 桜井清久(SAKURAI, Yasuhisa)[JP/JP] 〒168 東京都杉並区永福3-17-6 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者: および</b> <b>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)</b> 横山昌幸(YOKOYAMA, Masayuki)[JP/JP] 〒270 千葉県松戸市新松戸3-222 新松戸中央プラザハイツ205号 Chiba, (JP) 片岡一則(KATAOKA, Kazunori)[JP/JP] 〒277 千葉県柏市大室1083-4 柏ビレジ141-9 Chiba, (JP) 岡野光夫(OKANO, Teruo)[JP/JP] 〒272 千葉県市川市国府台6-12-12 Chiba, (JP)		福島重人(FUKUSHIMA, Shigeto)[JP/JP] 〒275 千葉県習志野市谷津3-1-32-405 Chiba, (JP) 植原隆治(UHARA, Ryuji)[JP/JP] 〒370-12 群馬県高崎市岩鼻町239 日化社宅B-11 Gunma, (JP) 阿久津智子(AKUTSU, Tomoko)[JP/JP] 〒371 群馬県前橋市表町2-15-7 Gunma, (JP) 岡本一也(OKAMOTO, Kazuya)[JP/JP] 〒120 東京都足立区千住1-29-1-707 Tokyo, (JP) 真柴洋子(MASHIBA, Hiroko)[JP/JP] 〒115 東京都北区志茂3-16-4 Tokyo, (JP) 町田芽久美(MACHIDA, Megumi)[JP/JP] 〒366 埼玉県深谷市上野台36-3 Saitama, (JP) 清水和久(SHIMIZU, Kazuhisa)[JP/JP] 〒370 群馬県高崎市飯塚町1264 Gunma, (JP) <b>(74) 代理人</b> 弁理士 川口義雄, 外(KAWAGUCHI, Yoshio et al.) 〒160 東京都新宿区新宿1丁目1番14号 山田ビル Tokyo, (JP)  <b>(81) 指定国</b> BR, CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  添付公開書類 国際調査報告書
<b>(54) Title: NOVEL ANTHRACYCLINE COMPOUND DERIVATIVES AND MEDICINAL PREPARATIONS CONTAINING THE SAME</b>		
<b>(54) 発明の名称</b> 新規アンスラサイクリン系化合物誘導体及びそれを含む医薬製剤		
<b>(57) Abstract</b> Di-, tri- or tetramers of anthracycline compounds which can be obtained by treating anthracycline compounds having an anticancer activity with an alkali and thus chemically binding these compounds directly to each other. Medicinal preparations comprising a high-molecular block copolymer/drug complex wherein the high-molecular block copolymer composed of a structural part of a hydrophilic polymer and another structural part of a hydrophobic polymer forms a micelle having the shell made of the hydrophilic part and a di-, tri- or tetramer of an anthracycline compound is contained optionally together with other drugs in the hydrophobic core. Medicinal preparations comprising a high-molecular block copolymer/drug complex wherein a high-molecular block copolymer composed of a structural part of a hydrophilic polymer and another structural part of a hydrophobic polymer forms a micelle having the shell made of the hydrophilic part and an anthracycline anticancer agent is contained in the hydrophobic core and capable of giving one hour after the intravenous administration to CDF1 mice of plasma anthracycline anticancer agent level (% of dose/ml of mouse plasma) of at least 10, when the anthracycline anticancer agent level in the preparation administered is taken as 100. These medicinal preparations have a potent drug effect but a low toxicity.		

BEST AVAILABLE COPY

(57) 要約

抗癌活性を有するアンスラサイクリン系化合物をアルカリ処理により直接化学結合させることにより得ることができる、アンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体。

親水性高分子構造部分と疎水性高分子構造部分とを有する高分子ブロック共重合体が親水性部分を外殻としたミセルを形成し、疎水性の内核にアンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体を単独で、または他の薬剤と共に含有することを特徴とする高分子ブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤。

親水性高分子構造部分と疎水性高分子構造部分とを有する高分子ブロック共重合体が親水性部分を外殻としたミセルを形成し、疎水性の内核にアンスラサイクリン系抗癌剤を含有する高分子ブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤であって、これをC D F 1マウスに静脈内投与した場合、投与した製剤中のアンスラサイクリン系抗癌剤の量を100とした時の1時間後のマウス血漿1ml中のアンスラサイクリン系抗癌剤の量(% of Dose/ml)が10以上となる医薬製剤。

上記医薬製剤は、高い薬効を有し毒性は低い。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	SD	スーダン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BB	バルバドス	GA	ガボーン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア共和国
BE	ベルギー	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BG	ブルガリア	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BJ	ベナン	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラ	TD	チャド
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	UA	ウクライナ	TG	トーゴ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TJ	タジキスタン
CA	カナダ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CC	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MR	モーリタニア	TR	トルコ
CG	コンゴ	IT	イタリア	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CN	中国	KG	キルギスタン	NL	オランダ	US	米国
CZ	チェコ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
DE	ドイツ	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル	YU	ユーゴスラビア
		LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア		
		LK	スリランカ				

## 明 細 書

新規アンスラサイクリン系化合物誘導体  
及びそれを含む医薬製剤

## 技術分野

本発明は、新規アンスラサイクリン系化合物誘導体およびそれを含有する高分子ブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤に関する。

## 背景技術

アンスラサイクリン系抗癌剤としては、放線菌の培養液より得られるダウノマイシン（英国特許第1003383号、米国特許第3616242号）やアドリアマイシン（米国特許第3590028号、米国特許第3803124号）などが知られ、実験腫瘍に対して広い抗癌スペクトルを有するのみならず、癌化学療法剤として臨床的に広く使用されている。しかしながら、その反面、しばしば白血球減少、脱毛、心筋障害等の重篤な副作用を伴うことが知られている。

この問題点を解決するために、種々の誘導体が提案されてい

る。例えば、ピラルビシン（一般名）はアドリアマイシンの糖部分の4'位にテトラヒドロピラニル基を導入し、毒性の低減を図っている。

またエピルビシン（一般名）はアドリアマイシンの糖部分の4'位の水酸基を $\alpha$ 位に結合させた化合物であり、毒性の低減を図っている。

しかしながらこれらの薬剤も、アドリアマイシンにくらべれば毒性は低いが、総投与量が制限されているなど、根本的な問題の解決には至っていない。

一方、ブロックコポリマーから形成される高分子ミセルを用いて水に難溶性の薬剤の溶解性を高める技術は公知であり、特開平2-300133、特開平6-107565、特開平5-955、特開平5-124969、特開平5-117385、特開平6-206830、特開平7-69900、特開平6-206815で得られる高分子ブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤はアドリアマイシン以上の抗腫瘍効果を有することが確認されている。

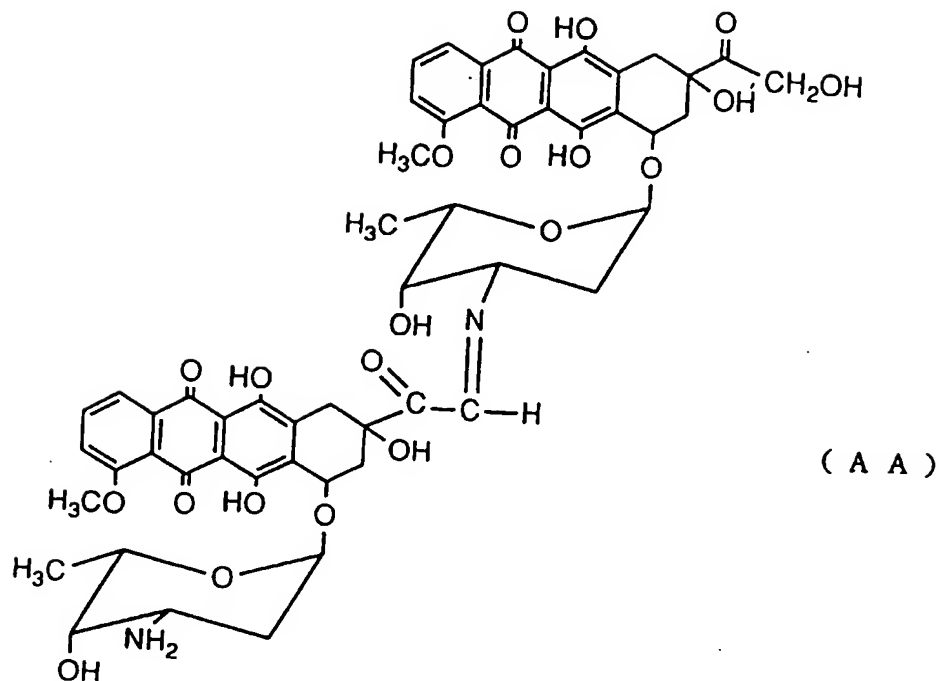
#### 発明の開示

本発明者らは、これまでの高分子ブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤に比べ、より強い効果と低い毒性を兼ね備えた高

分子ブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤について鋭意検討した結果、本発明を完成させた。

即ち本発明は、

- (1) 抗癌活性を有するアンスラサイクリン系化合物をアルカリ処理により直接化学結合させることにより得ることができる、アンスラサイクリン系化合物の2、3又は4量体、
- (2) アンスラサイクリン系化合物がアドリアマイシン、ダウノマイシン、ピラルピシン、エピルピシン及びそれらの酸塩から選ばれる1種以上である上記(1)記載のアンスラサイクリン系化合物の2、3又は4量体、
- (3) アドリアマイシンまたはその酸塩を、又は、アドリアマイシンまたはその酸塩とダウノマイシンまたはその酸塩をアルカリ処理により直接化学結合させることにより得ることができる、アンスラサイクリン系化合物の2量体、
- (4) アンスラサイクリン系化合物同士の結合様式がシッフベース結合である上記(1)、(2)または(3)記載のアンスラサイクリン系化合物の2、3又は4量体、
- (5) 下記式(AA)の構造を有するアドリアマイシンの2量体、

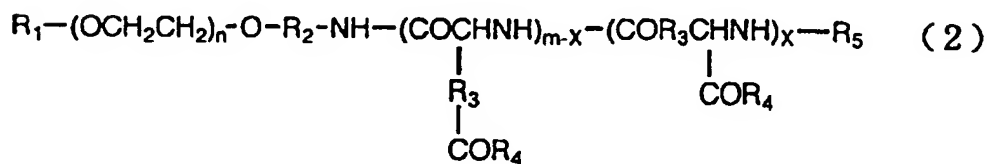
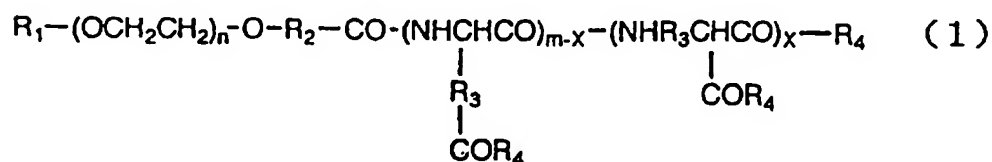


(6) アドリアマイシンまたはその酸塩をアルカリ処理により直接化学結合させることにより得ることができ、図7に示すマススペクトルを有するアドリアマイシンの3量体、

(7) 親水性高分子構造部分と疎水性高分子構造部分とを有する高分子ブロック共重合体が親水性部分を外殻としたミセルを形成し、疎水性の内核にアンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体を、必要により他の薬剤と共に、含有することを特徴とする高分子ブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤、

(8) アンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体が上記(1), (2), (3), (4), (5)又は(6)に記載のアンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体である上記(7)記載の高分子ブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤,

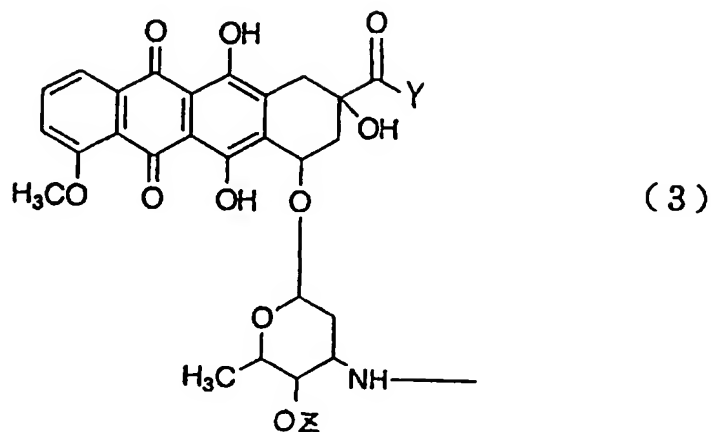
(9) 高分子ブロック共重合体が下記式(1)または(2)の構造を有する上記(7)又は(8)記載の高分子ブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤,

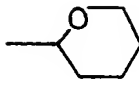


[式中、 $R_1$  は水素原子または低級アルキル基を表し、 $R_2$  は結合基を表し、 $R_3$  はメチレン基またはエチレン基を表し、 $R_4$  はそれぞれ独立して水酸基または抗癌活性を有するアンスラサイクリン系化合物の残基を表し、 $R_5$  は水素原子または保護基を表し、 $n$  は5～1,000、 $m$  は2～300、 $x$  は0～

300の整数を示すが、xはmより大きくないものとする。]

(10) 抗癌活性を有するアンスラサイクリン系化合物の残基が、下記式(3)



[式中、Yは $-\text{CH}_2\text{OH}$ 又は $-\text{CH}_3$ を、ZはH又は を示す。]

で示される基である上記(9)に記載の高分子ブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤、

(11) 高分子ブロック共重合体が形成するミセルの内核に、高分子ブロック共重合体に対して2~60重量%のアンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体を含有する上記(7), (8), (9)又は(10)に記載の高分子ブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤、



(12) アンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体がアドリアマイシンの2量体である上記(7), (8), (9), (10)又は(11)記載の高分子ブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤,

(13) 高分子ブロック共重合体が形成するミセルの内核にアンスラサイクリン系抗癌剤とアンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体を1:0.5~20の重量比で含有する上記(7), (8), (9), (10), (11)又は(12)記載の高分子ブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤,

(14) アンスラサイクリン系抗癌剤とアンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体を1:0.7~10の重量比で含有する上記(13)記載の高分子ブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤,

(15) アンスラサイクリン系抗癌剤とアンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体を1:1~5の重量比で含有する上記(13)記載の高分子ブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤,

(16) アンスラサイクリン系抗癌剤がアドリアマイシン、ダウノマイシン、ピラルビシン、エピルビシン及びそれらの酸塩から選ばれる1種以上である上記(13), (14)又は(15)記

載の高分子ブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤，

(17) 親水性高分子構造部分と疎水性高分子構造部分とを有する高分子ブロック共重合体が親水性部分を外殻としたミセルを形成し、疎水性の内核にアンスラサイクリン系抗癌剤を含有する高分子ブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤であって、これを7～9週齢のCDF1マウスに静脈内投与した場合、投与した製剤中のアンスラサイクリン系抗癌剤の量を100とした時の1時間後のマウス血漿1ml中のアンスラサイクリン系抗癌剤の量(% of Dose/ml)が10以上となる医薬製剤，

(18) 1時間後のマウス血漿1ml中のアンスラサイクリン系抗癌剤の量(% of Dose/ml)が20～60となる上記(17)記載の医薬製剤，

(19) アンスラサイクリン系抗癌剤が、アドリアマイシン、ダウノマイシン、ピラルビシン、エピルビシン及びそれらの酸塩から選ばれる1種以上である上記(17)又は(18)記載の医薬製剤，

(20) 固形癌治療用の上記(7)～(19)のいずれかに記載の医薬製剤，  
に関する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 はアドリアマイシンの 2 量体の赤外吸収スペクトルを示す図である。

図 2 はアドリアマイシンの 2 量体の紫外吸収スペクトルを示す図である。

図 3 はアドリアマイシンの 2 量体のマスマスペクトルを示す図である。

図 4 はアドリアマイシンの 2 量体を酸処理した際にアドリアマイシンと同時に生成する式 (4) の構造を有すると予想される化合物の赤外吸収スペクトルを示す図である。

図 5 はアドリアマイシンの 2 量体を酸処理した際にアドリアマイシンと同時に生成する式 (4) の構造を有すると予想される化合物の紫外吸収スペクトルを示す図である。

図 6 はアドリアマイシンの 2 量体を酸処理した際にアドリアマイシンと同時に生成する式 (4) の構造を有すると予想される化合物のマスクロマトグラム ( $m/z = 560$ ) を示す図である。

図 7 はアドリアマイシンの 3 量体のマスマスペクトルを示す図である。

図 8, 9, 10, 11 はそれぞれ実施例 1 (2) における分

取成分のNMR分析の $^1\text{H}$ の1次元スペクトル、 $^{13}\text{C}$ の1次元スペクトル、COSYスペクトル、CH COSYスペクトルを示す図である。

図12はダウノマイシンとアドリアマイシンの2量体のマスペクトルを示す図である。

図13は実施例3で得られた医薬製剤のHPLCクロマトグラムを示す図である。

図14は実施例4で得られた医薬製剤のHPLCクロマトグラムを示す図である。

図15は実施例5で得られた医薬製剤のHPLCクロマトグラムを示す図である。

図16は応用例1における、アドリアマイシン塩酸塩を投与した場合の、マウス大腸癌Colon 26の腫瘍増殖曲線を示す図である。

図17は応用例1における、実施例3の医薬製剤を投与した場合の、マウス大腸癌Colon 26の腫瘍増殖曲線を示す図である。

図18は、実施例6で得られた医薬製剤のHPLCクロマトグラムを示す図である。

図 1 9 は、実施例 7 で得られた医薬製剤の H P L C クロマトグラムを示す図である。

図 2 0 は、実施例 8 で得られた医薬製剤の H P L C クロマトグラムを示す図である。

図 2 1 は、実施例 9 で得られた医薬製剤の H P L C クロマトグラムを示す図である。

図 2 2 は、実施例 1 0 で得られた医薬製剤の H P L C クロマトグラムを示す図である。

図 2 3 は、実施例 1 1 で得られた医薬製剤の H P L C クロマトグラムを示す図である。

図 2 4 は、実施例 1 2 で得られた医薬製剤の H P L C クロマトグラムを示す図である。

図 2 5 , 2 6 , 2 7 はそれぞれ、応用例 3 における、アドリアマイシン塩酸塩、実施例 8 の医薬製剤、実施例 1 2 の医薬製剤を投与した場合の、マウス大腸癌 C o l o n 2 6 の腫瘍増殖曲線を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明を詳細に説明する。

本発明によれば、従来のアンスラサイクリン系抗癌剤または

高分子ブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤と比較して高い効果と低い毒性を有する医薬製剤を得ることができる。

本発明に用いられる抗癌活性を有するアンスラサイクリン系化合物としては、アドリアマイシン、ダウノマイシン、ピラルビシン、エピルビシンまたはそれらの酸塩等が挙げられる。

本発明のアンスラサイクリン系化合物の2，3又は4量体を得る方法は特に限定されず、例えば、抗癌活性を有するアンスラサイクリン系化合物をアルカリ処理することにより得ることができる。アルカリ処理することにより、アンスラサイクリン系化合物同志が直接化学結合して（即ち架橋剤を用いこれを介して化学結合するのではなく、アンスラサイクリン系化合物の官能基間で反応して結合し）、その2，3又は4量体を得られる。

アンスラサイクリン系化合物の2，3又は4量体は、同種のもの同士が結合したものであってもよく、又、異種のものが結合したものであってもよい。

アルカリ処理としては、アンスラサイクリン系化合物を溶媒に溶解し、これに塩基を加える方法が挙げられる。用いる溶媒としては、該化合物を溶解できれば特に限定されず、例えば水、

N, N-ジメチルホルムアミド (DMF)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ジオキサン、テトラヒドロフラン (THF)、メタノール、アセトニトリルおよびそれらの混合溶媒が使用できる。

加える塩基としては、該溶液に溶解でき、塩基を加えた後の pH が 7 を越える 14 までの値となるものであれば無機塩基、有機塩基およびそれらの塩のいずれも使用でき、特に限定されない。又、塩基の濃度も特に限定されない。好ましい塩基としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸水素カリウム、リン酸ナトリウム、リン酸 1 水素 2 ナトリウム、リン酸 2 水素 1 ナトリウム、リン酸カリウム、リン酸 1 水素 2 カリウム、リン酸 2 水素 1 カリウム、炭素数 2 ~ 20 の 2 級アミン、3 級アミンまたはそれらの酸塩付加物が挙げられる。アルカリ処理する際の pH は 7 を越える 14 までの値であるが好ましくは 8 ~ 10 である。

アルカリ処理の温度は、溶液が凍結または沸騰しなければ、特に限定されないが、好ましくは、0 ~ 50℃、より好ましくは 0 ~ 40℃である。処理の時間は 1 分 ~ 120 時間、好まし

くは、10分～24時間である。

得られたアンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体は公知の精製方法により精製が可能である。例えば、凍結乾燥、沈析等により固形分を得、または透析、限外濾過により溶媒を置換し、凍結乾燥、沈析等により固形分が得られる。この固形分を更に精製するには、薄層クロマトグラフィーや液体クロマトグラフィー等の方法が利用できる。

アンスラサイクリン系化合物として、カルボニル構造を持つ置換基とアミノ基を有する化合物を用いた場合、又は、カルボニル構造を持つ置換基を有する化合物とアミノ基を有する化合物を併用した場合は、上記アルカリ処理により、アンスラサイクリン系化合物同士がシッフベース結合により化学結合した2, 3又は4量体を得られる。従って、アンスラサイクリン系化合物としては、カルボニル構造を持つ置換基とアミノ基を有する化合物を使用するのが好ましく、又は、カルボニル構造を持つ置換基を有する化合物とアミノ基を有する化合物を併用するのが好ましい。ここで、カルボニル構造を持つ置換基としては、水酸基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等ハロゲン原子などで置換されていてもよい炭素数2～5のアシル基



もしくは水酸基、ハロゲン原子などで置換されていてもよい炭素数3～10までのアシルアルキル基が挙げられる。

アンスラサイクリン系化合物同士がシッフベース結合で結合した2, 3又は4量体は、酸処理すると少なくとも原料として用いたアンスラサイクリン系化合物を生成する。このアンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体を酸処理する方法としては、これを溶媒に溶解し、酸を加える方法が挙げられる。ここで用いる溶媒は、該化合物を溶解できれば、特に限定されないが、水、N, N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ジオキサン、テトラヒドロフラン(THF)、メタノール、アセトニトリルおよびそれらの混合溶媒等が使用できる。加える酸としては、塩酸、硝酸、硫酸、磷酸等の無機酸、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸等の有機酸など何れも用いることが可能である。

酸処理のpHは2～4が好ましく、処理温度は溶液が凍結または沸騰しなければ、特に限定されず好ましくは0～50℃、特に好ましくは20～40℃である。処理の時間は1分～120時間、好ましくは24～72時間である。

上記のアルカリ処理により直接化学結合させることにより得

ることができる本発明のアンスラサイクリン系化合物の 2, 3  
又は 4 量体の一例としては、図 1 に示す赤外吸収スペクトルを  
有し、図 2 に示す紫外吸収スペクトルを有するアドリアマイシ  
ンの 2 量体が挙げられる。このアドリアマイシンの 2 量体は、  
更に図 3 に示すマススペクトルを有す。このアドリアマイシ  
ンの 2 量体は、前記式 (A A) の構造を有する。

赤外吸収スペクトル : 1 6 7 6、1 4 1 7、1 2 1 7、  
1 1 5 8  $\text{cm}^{-1}$

紫外吸収スペクトル :  $\lambda_{\text{max}} = 486 \text{ nm}$

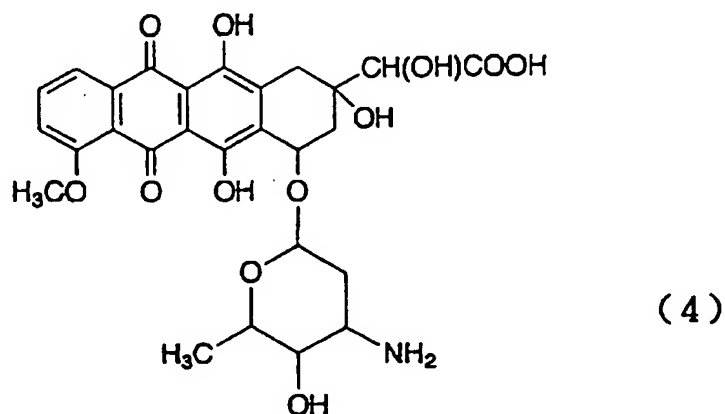
マススペクトル (ESI)、 $m/z$  (%) :

1 0 6 7 (1 0 0)、9 6 4 (1 0)、9 3 8 (1 5)、  
9 2 1 (1 3)、6 5 3 (2 0)、5 2 4 (2 0)、5 0 6  
(5 0)、4 8 8 (9 8)。

なお上記スペクトルを測定するために使用した機器および測  
定条件は次の通りである。赤外吸収スペクトル測定には、パー  
キンエルマー社製システム 2 0 0 0 型を用い、K B r 錠剤法  
にて測定した。紫外吸収スペクトル測定には、日立社製 U  
3 2 0 0 型分光光度計を用い、メタノール溶液にて測定を行っ  
た。マススペクトルの測定には、V G 社製 Q U A T T R O 2 型

質量分析計を用い、エレクトロスプレー方式にて測定を行った。

このアドリアマイシンの2量体は、酸処理するとアドリアマイシンを生成するが、その際、下記式(4)



で表される構造式を有すると推定される化合物も生成する。この式(4)の構造を有すると推定される化合物の赤外吸収スペクトルを図4に、紫外吸収スペクトルを図5に、LC/MSによる $m/z = 560$ でのマスキロマトグラムを図6に示す。

なおこのスペクトルおよびクロマトグラムを測定するために使用した機器および測定条件は次の通りである。赤外吸収スペクトルの測定は図1のスペクトルの測定と同一の装置および条件にて測定を行った。紫外吸収スペクトルの測定には、日立社製U3200型を用い、ベンジルアルコール溶液にて測定を行

った。LC / MS によるマスキロマトグラム測定 of 機器および測定条件は以下に示した通りである。

LC :

カラム : ウォーターズ製 C 4 ・ 3 0 0 オングストロム / 5  $\mu$  m

溶離液 : アセトリル / 0.1% トリフルオロ酢酸 + 0.05%

MS 7 (MS 7 : ガスクロ工業製)

グラジエント溶出法

時間 (分)	0	20	25	30	35	36	40
--------	---	----	----	----	----	----	----

アセトリル 濃度 (%)	22	40	50	90	90	22	22
--------------	----	----	----	----	----	----	----

流 速 : 1 m l / m i n

MS : VG 社製 Q U A T T R O 2 (エレクトロスプレー法)

また上記のアルカリ処理により直接化学結合させることにより得ることができる本発明のアンストラサイクリン系化合物の 2、3 又は 4 量体の他の例としては、図 7 に示すマススペクトルを有し、酸処理した場合アドリアマイシンを生成するアドリアマイシンの 3 量体が挙げられる。

本発明の高分子ブロック共重合体 - 薬剤複合体医薬製剤に用いられる高分子ブロック共重合体の親水性高分子構造部分の構造としては、例えばポリエチレングリコール、ポリサッカライ

ド、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、キトサン等の構造が挙げられるが、親水性高分子構造であれば特に限定されない。特に好ましい構造は、ポリエチレングリコール構造である。

疎水性高分子構造部分としては、例えばポリスチレン、ポリアミノ酸（ポリアスパラギン酸、ポリグルタミン酸、ポリリジン等）、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリマレイン酸、それらの誘導体またはそれらの塩等が挙げられるが、疎水性高分子構造であれば特に限定されない。好ましくはポリアミノ酸、その誘導体またはそれらの塩であり、特に好ましくは、ポリアスパラギン酸、ポリグルタミン酸、その誘導体またはそれらの塩である。塩としてはナトリウム塩、カリウム塩等が挙げられるが、特に限定されるものではない。

ポリアミノ酸構造の誘導体としては、例えばその側鎖に芳香族アミン、脂肪族アミン、芳香族アルコール、脂肪族アルコール、芳香族チオール、脂肪族チオール、等の疎水性化合物を結合させた誘導体が挙げられるが、側鎖に結合する疎水性基は、側鎖に結合でき、ポリアミノ酸部分を疎水性にできれば特に限定されない。好ましくは、芳香環を有するアミンを側鎖に結合

したポリアスパラギン酸誘導体またはポリグルタミン酸誘導体である。

高分子ブロック共重合体の好ましいものとしては、前記式(1)又は(2)の構造を有するものが挙げられる。

前記式(1)および(2)において、 $R_1$ は水素原子または低級アルキル基を表し、低級アルキル基としては例えば炭素数1～3のアルキル基が挙げられ、好ましくはメチル基である。

$R_2$ で表される結合基としてはポリエチレングリコール構造部分の末端に、ポリアミノ酸構造部分を形成させる際、ポリエチレングリコール構造部分を形成することになる化合物の末端を該形成に適した構造に変換させるために使用した方法及び化合物に対応した構造をとる。例えばメチレン基、エチレン基、プロピレン基、トリメチレン基、イソブチレン基等の炭素数1～8のアルキレン基が挙げられるが、好ましくはトリメチレン基である。

$R_3$ はメチレン基またはエチレン基を表し、好ましくはメチレン基である。

$R_4$ はそれぞれ独立して水酸基または抗癌活性を有するアンラサイクリン系化合物の残基を表す。抗癌活性を有するアン

スラサイクリン系化合物の残基としては種々のものが使用でき、特に限定されないが、好ましくは式(3)で表される基である。式(3)で表される基の具体的な例としては、アドリアマイシン、ダウノマイシン、ピラルビシン、エピルビシンの残基が挙げられる。

R<sub>4</sub>はそれぞれ独立して水酸基または抗癌活性を有するアンスラサイクリン系化合物を示すが、高分子ブロック共重合体中に存在するR<sub>4</sub>の総数のうちの少なくとも一部特に5～80%が抗癌活性を有するアンスラサイクリン系化合物の残基であることが好ましく、その中でも20～60%が該アンスラサイクリン系化合物の残基であることが好ましい。

R<sub>4</sub>はそれぞれ独立して水酸基または抗癌活性を有するアンスラサイクリン系化合物の残基を示すが、該アンスラサイクリン系化合物の残基の代りにアントラセン骨格又はアントラキノ骨格を有する基例えば特開平6-206830号公報に記載されているアントラセン骨格又はアントラキノ骨格を有する置換基を用いてもよい。

R<sub>5</sub>は水素原子または保護基を表すが、保護基としては、例えば脂肪族アシル基または芳香族アシル基が挙げられる。保護

基の導入法としては、公知の方法、例えば酸無水物による方法や、酸ハロゲン化物による方法などが挙げられるが、特に限定されるものではない。R<sub>5</sub>の好ましいものとしては、水素原子、またはアセチル基である。

又、nは5～1,000であるが、好ましくは15～400であり、mは2～300であるが、好ましくは10～100であり、xは0～300であるが、好ましくは0～100である。

高分子ブロック共重合体は、水溶性であるかぎりその分子量は特に限定されないが、好ましくは1000～100000、特に好ましくは5000～50000である。高分子ブロック共重合体中の親水性高分子構造部分と疎水性高分子構造部分の割合は、本発明の医薬製剤の水溶性が保たれる限り特に限定されないが、好ましくは1:0.1～10（重量比）、特に好ましくは1:0.1～5（重量比）である。

高分子ブロック共重合体のミセルの内核に含有させる、アンラサイクリン系化合物の2,3又は4量体でない他の薬剤は、必ずしも必須成分ではないが、この薬剤としては、例えば、アドリアマイシン、ダウノマイシン、ピラルビシン、エピルビシン、メトトレキセート、マイトマイシンC、エトポシド、シス



プラチン及びその誘導体等の抗癌剤が挙げられ、好ましくはアンスラサイクリン系抗癌剤であり、特に好ましくはアドリアマイシン、ダウノマイシン、ピラルビシン、エピルビシンまたはその酸塩である。

高分子ブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤中のアンスラサイクリン系化合物の2，3又は4量体の含有量は高分子ブロック共重合体に対して、好ましくは1～100重量％であり、特に好ましくは2～60重量％である。しかしながら、高分子ブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤のミセル形成性を損なわない限り、可能な限り多く含有させることに何等問題はない。

高分子ブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤中のアンスラサイクリン系化合物の2，3又は4量体でない他の薬剤の含有量は高分子ブロック共重合体に対して、好ましくは0～100重量％であり、特に好ましくは2～60重量％である。しかしながら、高分子ブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤のミセル形成性を損なわない限り、可能な限り多く含有させることに何等問題はない。

高分子ブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤が「アンスラサイクリン系化合物の2，3又は4量体でない他の薬剤」を含

む場合、該医薬製剤中に含まれる「アンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体でない他の薬剤」と「アンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体」の割合は通常重量比で1 : 0.05 ~ 100であるが、好ましくは重量比で1 : 0.5 ~ 20であり、より好ましくは重量比で1 : 0.7 ~ 10であり、特に好ましくは重量比で1 : 1 ~ 5である。

なお、高分子ブロック共重合体のミセルの内核に含有せしめるアンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体は特に限定されないが、前記(1) ~ (6)に記載したアンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体が好ましい。これら2, 3又は4量体は、これらの一種のみをミセルの内核に含有せしめてもよいが、二種以上をミセルの内核に含有せしめてもよい。

高分子ブロック共重合体の製法は公知であり、例えば次のようにして製造することができる。即ち、親水性高分子構造部分を構成することになる化合物(例えば、ポリエチレングリコール、ポリサッカライド、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、キトサンあるいはこれらの誘導体)またはその末端を変性したものに、疎水性高分子構造部分を構成することになる高分子化合物

を反応させることにより、または、親水性高分子構造部分を構成することになる化合物またはその末端を変性したものと重合性のモノマーを反応させ、必要に応じさらに誘導体化する等の化学反応を行うことにより得ることができる。

誘導体化の例としては、疎水性高分子構造部分が高分子カルボン酸構造を有する場合、その疎水性を高めるために、疎水性化合物を反応させることが挙げられる。疎水性化合物はエステル結合又はアミド結合等を形成することにより高分子ブロック共重合体に結合する。これらの反応は公知のエステル化又はアミド化等の常法に従って行うことができる。例えば、親水性高分子構造部分と高分子カルボン酸部分を有する高分子ブロック共重合体（原料共重合体）にアミド結合で疎水性化合物を結合させる際、反応はペプチド結合生成法として知られる常法に準じて行うことができる。例えば、酸ハロゲン化物法、酸無水物法、カップリング法等が使用できるが、縮合剤を使用するカップリング法が望ましい。縮合剤としては1-エチル-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）、1-エチル-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（EDC・HCl）、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DC

C)、カルボニルイミダゾール(CDI)、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(EEDQ)、ジフェニルホスホリルアジド(DPPA)等が使用できる。縮合剤は、疎水性化合物に対して0.5~20倍モル用いるのが好ましく、特に1~10倍モル用いるのが好ましい。またこの際、N-ヒドロキシサクシンイミド(HONSu)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボン酸イミド(HONB)等を共存させてもよい。

原料共重合体に疎水性化合物を結合させる反応を行なう際に、疎水性化合物の使用量は特に限定されないが、通常原料共重合体のカルボキシル基1当量に対し、0.1~2モル用いる。

縮合反応は溶媒中で行うのが好ましく、溶媒としては、例えばN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ジオキサン、テトラヒドロフラン(THF)、水及びそれらの混合溶媒等種々のものが使用でき、特に限定されない。溶媒の使用量は、特に限定されないが、通常原料共重合体に対して1~500重量倍用いる。

縮合反応は、-10~50℃で行うのが好ましく、特に、

- 5 ~ 40℃で行うのが好ましい。反応は2 ~ 48時間行えば十分である。

本発明の高分子ブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤は、例えば、次のような方法で製造が可能である。第1法として、得られた高分子ブロック共重合体を溶媒に溶解する。この溶媒は、例えばN, N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ジオキサン、テトラヒドロフラン(THF)、水及びそれらの混合溶媒等種々のものが使用できるが、好ましくDMFまたはDMFと水の混合溶媒である。この溶液にアンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体を、高分子ブロック共重合体に対して1 ~ 200% (重量比) 加え、攪拌する。この混合溶液を、透析、限外濾過等で水に溶媒置換することにより、目的の高分子ブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤が得られる。他の薬剤も含有させる場合は、アンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体と共に他の薬剤を高分子ブロック共重合体に対して1 ~ 200重量%加えればよい。

第2法として、アンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体の合成を高分子ブロック共重合体への含有と同時にを行い、高分子ブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤を製造すること

もできる。例えば、高分子ブロック共重合体を溶媒に溶解する。この溶媒としては例えばN, N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ジオキサン、テトラヒドロフラン(THF)、水及びそれらの混合溶媒等種々のものが使用できるが、好ましくはDMFまたはDMFと水の混合溶媒である。ここにアンスラサイクリン系化合物またはその塩(例えば前記のアンスラサイクリン系抗癌剤)を溶解し、塩基を加え、攪拌する。この混合溶液を、透析、限外濾過等で水に溶媒置換することにより、目的の高分子ブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤が得られる。

第2法において、高分子ブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤中のアンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体と他の薬剤の組成比は、次のような方法で制御できる。例えば、アンスラサイクリン系化合物またはその塩(アンスラサイクリン系抗癌剤)の仕込量を、用いる高分子ブロック共重合体に対して変化させることにより、又はpHを変化させることにより、得られる高分子ブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤中のアンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体とアンスラサイクリン系化合物(アンスラサイクリン系抗癌剤)の組成比を制

御できる。

又、本発明は、親水性高分子構造部分と疎水性高分子構造部分とを有する高分子ブロック共重合体が親水性部分を外殻としたミセルを形成し、疎水性の内核にアンスラサイクリン系抗癌剤を含有する高分子ブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤であって、これを7～9週齢のCDF1マウスに静脈内投与した場合、投与した製剤中のアンスラサイクリン系抗癌剤の量を100とした時の1時間後のマウス血漿1ml中のアンスラサイクリン系抗癌剤の量(% of Dose/ml)が10以上、好ましくは20～60となる医薬製剤に関する。

このような医薬製剤としては、前記の、ミセルの内核にアンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体をアンスラサイクリン系抗癌剤と共に含有する高分子ブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤が挙げられる。

従来市販されている抗癌剤、例えばアドリアマイシンを人体に静脈投与した場合、その血中濃度は極めて短時間のうちに低下してしまう。ところが、本発明の医薬製剤を静脈投与した場合、その血中濃度は長時間高く保持されるため、アンスラサイクリン系抗癌剤を腫瘍組織に多量にとりこませることが可能と

なり、癌の治療を効果的に行なうことができる。

本発明の高分子ブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤の薬理効果は高く、例えば抗癌剤とした場合の抗癌活性は、アドリアマイシンと投与量においてあまり差がないにもかかわらず画期的に高いものである。特に、従来の抗癌剤を用いた場合には困難であった固形癌の消失という極めて顕著な効果が得られる。従って、肺癌、消化器癌、乳がん、膀胱癌、骨肉腫、等の固形癌の患者に対しても特に有効である。又、本発明の高分子ブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤は、毒性が低いという優れた効果も有する。

本発明の医薬製剤は、一般的に使用される種々の剤型例えば、担体、賦形剤、希釈剤、溶解補助剤等の製薬上許容し得る添加剤と混合した固形剤、軟膏、液剤などの形で使用し得るが、抗癌剤として使用する場合は通常注射剤として使用され、添加剤の割合は全体の99.99～1%であることが好ましい。その投与量は、通常、アンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体とその他の薬剤の合計量に換算して、1週間あたり1～3回投与で、10～200mg/m<sup>2</sup>週程度である。



## 実施例

次に実施例により本発明を具体的に説明する。

### 実施例 1

(1) アドリアマイシン塩酸塩 10 mg を DMF 3 ml、水 1 ml、トリエチルアミン 10  $\mu$ l からなる混合溶媒に溶解し、遮光下 28  $^{\circ}$ C にて 12 時間反応させた。反応液を分画分子量 1000 の透析膜を用いて、水に対して透析し、溶媒を水に置換した。これを HPLC にて分取精製し、アドリアマイシンの 2 量体の水溶液を得た。これを凍結乾燥し、式 (AA) の構造を有するアドリアマイシンの 2 量体の固形分を得た。

このアドリアマイシンの 2 量体は前に示した赤外吸収スペクトル、紫外吸収スペクトル、LC/MS によるマススペクトルを有していた。得られたアドリアマイシンの 2 量体を 1% 酢酸にて酸処理し、得られる生成物のマスキロマトグラムを図 6 に示した。

なお分取精製に用いた HPLC、スペクトル及びクロマトグラム測定は、前に示した機器および測定条件等と同一である。

(2) アドリアマイシン塩酸塩 500 mg を DMF 40 ml、メタノール 40 ml からなる混合溶媒に溶解し、更にトリエチ

ルアミン 1. 2 ml 加え、これを 25℃ にて 12 時間反応させた。この反応液を、内径 2.6 mm、長さ 65 cm のガラス管に LH-20 (ファルマシア製) を 350 ml 充填したカラムにて精製した。このカラム精製における移動相にはメタノールを用い、5 ml/min の流速で送液した。フラクションを 5 ml ずつとり、11~25 番目のフラクションを集め、蒸発乾固し、質量分析計により分析し、アドリアマイシンの 2 量体の生成を確認した。また高分解能マススペクトルによる分析の結果、分子式は  $C_{54}H_{54}N_2O_{21}$  であった。

得られたアドリアマイシンの 2 量体のうち 10 mg をメタノール 2 ml に溶解し、 $NaBH_3CN$  を 1 mg 加え、室温で 12 時間反応させた後、1 N 塩酸を 3 ml 加え、12 時間反応させた。この反応液を LC/MS により分析し、 $m/z$  524 のピークを分取し、NMR により分析を行った。NMR 分析の結果、図 8 に示す  $^1H$  の 1 次元スペクトル、図 9 に示す  $^{13}C$  の 1 次元スペクトル、図 10 に示す COSY スペクトル、図 11 に示す  $CH-COSY$  スペクトルが得られた。

これらの結果より、式 (AA) の構造を有するアドリアマイシンの 2 量体であることを確認した。

(3) アドリアマイシン塩酸塩 500 mg を DMF 40 ml、メタノール 40 ml からなる混合溶媒に溶解し、更にトリエチルアミン 1.2 ml 加え、これを 25℃ にて 12 時間反応させた。この反応液を、内径 26 mm、長さ 65 cm のガラス管に LH-20 (ファルマシア製) を 350 ml 充填したカラムにて精製した。このカラム精製における移動相にはメタノールを用い、5 ml/min の流速で送液した。フラクションを 5 ml ずつとり、5～9 番目のフラクションを集め、蒸発乾固し、質量分析計により分析し、図 7 に示したマススペクトルを得た。この結果によりアドリアマイシンの 3 量体の生成を確認した。

#### 実施例 2

アドリアマイシン塩酸塩 5 mg とダウノマイシン塩酸塩 5 mg とを DMF 3 ml、水 1 ml、トリエチルアミン 10  $\mu$ l からなる混合溶媒に溶解し、遮光下 28℃ にて 12 時間反応させた。未精製のままの反応液について LC/MS によるマススペクトル分析を行い、アドリアマイシンの 2 量体の生成とダウノマイシンとアドリアマイシンの 2 量体の生成を確認した。

生成物のうち、アドリアマイシンの 2 量体のマススペクトルは前に示したものと同一であった。ダウノマイシンとアドリア

マイシンの2量体のマススペクトルを図12に示した。この反応条件では、ダウノマイシンの2量体は生成しなかった。なお、これらのスペクトルを得るための機器及び条件は前に示した方法と同一である。

ダウノマイシンとアドリアマイシンの2量体のマススペクトル (ESI)、 $m/z$  (%)、: 1051 (90)、948 (15)、922 (20)、904 (10)、653 (20)、524 (30)、506 (50)、488 (100)。

### 実施例 3

片末端メトキシ基片末端3-アミノプロピル基のポリエチレングリコール (PEG-NH<sub>2</sub>) (分子量 13,900) 20.0 g を N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) 100 ml に溶解した。その溶液に  $\beta$ -ベンジルーL-アスパルテート-N-カルボン酸無水物 (BLA-NCA) 15.0 g を加えた。35℃の温浴上攪拌しながら24時間重合反応を行った。次いで、氷浴上攪拌しながら、重合液を0.5 N 水酸化ナトリウム水溶液中に加え、20分間攪拌した。次いで、2 N 塩酸を加え pH をほぼ4とし、蒸留水を加え全量を20リットルに希釈した後 pH を4に調整した。次いで、ホローファイバー型限

外濾過装置（アミコン C H 2、限外濾過後の分画分子量 = 10,000）を用いて、濃縮、水洗を繰り返した。次いで、濃縮液をスルホン酸型イオン交換樹脂（アンバーライト I R - 120 B）カラムを用いて精製した。溶出液を減圧濃縮、さらに凍結乾燥して、ポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸ブロック共重合体（P E G - P（A s p .））19.58 g を得た。この P E G - P（A s p .）5.008 g を D M F 83 m l に溶解しさらにアセトニトリル 83 m l を加えた。これにジシクロヘキシルカルボジイミド（D C C）8.979 g を加え 5 分間攪拌後、アドリアマイシン塩酸塩 2.528 g を D M F 167 m l に溶解しトリエチルアミン 786  $\mu$  l を添加した溶液を加えた。次いで、室温で攪拌しながら 4 時間反応させた。反応後 1 % 磷酸水溶液 16.7 m l を加え 5 分間攪拌した。透析膜（分画分子量 = 12,000 ~ 14,000）を用いて透析した後、濾過により D C C 由来の沈殿を除去した。濾液をホローファイバー型限外濾過装置（アミコン C H 2、限外濾過膜の分画分子量 = 10,000）を用いて精製した。さらに A D V A N T E C U K - 50（分画分子量 = 50,000）の限外濾過膜で限外濾過することにより濃縮し、アドリアマイ

シン換算で  $12 \text{ mg} / \text{ml}$  (紫外分光光度計で  $485 \text{ nm}$  の吸収より算出) の水溶液  $177 \text{ ml}$  を得た。得られた  $\text{PEG-P (Asp.)ADR}$  は前記式 (2) の構造を有し、 $R_1$  はメチル基、 $R_2$  はトリメチレン基、 $R_3$  はメチレン基、 $R_4$  の一部は水酸基で残りは前記残基式 (3) [ $Y$  は  $\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $Z$  は  $\text{H}$ ]、 $R_5$  は水素を表し、 $n = 315$ 、 $m = 30$ 、 $x = 8$  である。アドリアマイシン含有率は  $32.3$  重量% あるが良好な水溶性を示した。この  $\text{PEG-P (Asp.)ADR}$  の  $12 \text{ mg} / \text{ml}$  (アドリアマイシン換算) の水溶液  $20 \text{ ml}$  と、アドリアマイシン塩酸塩  $258.8 \text{ mg}$  を  $\text{DMF } 60 \text{ ml}$  に溶解しトリエチルアミン  $100 \mu\text{l}$  を添加した溶液とを混合し遮光下室温で  $2$  時間攪拌した。透析膜 (分画分子量 =  $12,000 \sim 14,000$ ) を用いて透析した後内液を凍結乾燥した。水に再溶解し  $\text{ADVANTEC UK-50}$  (分画分子量 =  $50,000$ ) の限外濾過膜で限外濾過することにより精製、濃縮した。さらに  $0.45 \mu\text{m}$  のフィルターを用いて濾過してブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤の水溶液  $25.3 \text{ ml}$  を得た。得られた水溶液は図 13 に示す  $\text{HPLC}$  のクロマトグラムを有していた。図中①のピークはアドリアマイシンであり、

②のピークはアドリアマイシンの2量体であり、③のブロードなピークはポリマーに結合したアドリアマイシンである。アドリアマイシン（①ピーク）の濃度は3.06 mg/mlであり、アドリアマイシンの2量体（②ピーク）の濃度は3.18 mg/mlであった。アドリアマイシンとアドリアマイシンの2量体の重量比は1:1.04であった。

HPLCの測定条件は以下の通りである。

カラム：ウォーターズ製C4・300オングストロム / 5 μm

溶離液：アセトニトリル / 1% 酢酸 + 40 mM ドデシル硫酸ナトリウム

グラジエント溶出法

時間（分）	0	4	12	25	30	31
アセトニトリル 濃度（%）	15	35	35	85	85	15

検 出：485 nm

流 速：1 ml/min

#### 実施例 4

実施例 3 で作成したPEG-P (Asp.)ADRの12 mg/ml（アドリアマイシン換算）の水溶液20 mlと、アドリアマイシン塩酸塩102.4 mgをDMF 60 mlに溶解し

トリエチルアミン 32  $\mu$ l を添加した溶液とを混合し遮光下室温で 2 時間攪拌した。透析膜（分画分子量 = 12,000 ~ 14,000）を用いて透析した後内液を凍結乾燥した。水に再溶解し ADVANTEC UK-50（分画分子量 = 50,000）の限外濾過膜で限外濾過することにより精製、濃縮した。さらに 0.45  $\mu$ m のフィルターを用いて濾過してブロック共重合体-薬剤複合体医薬剤の水溶液 20.4 ml を得た。得られた水溶液は図 14 に示す HPLC のクロマトグラムを有していた。図中①のピークはアドリアマイシンであり、②のピークはアドリアマイシンの 2 量体であり、③のブロードなピークはポリマーに結合したアドリアマイシンである。アドリアマイシン（①ピーク）の濃度は 3.01 mg/ml であり、アドリアマイシンの 2 量体（②ピーク）の濃度は 0.39 mg/ml であった。アドリアマイシンとアドリアマイシンの 2 量体の重量比は 1 : 0.13 であった。HPLC の測定条件は実施例 3 と同一である。

#### 実施例 5

実施例 3 で作成した PEG-P (Asp.) ADR の 12 mg/ml（アドリアマイシン換算）の水溶液 20 ml に水 20



m l を加えて希釈し、その後凍結乾燥した。水 20 m l に再溶解し、さらに酢酸及び酢酸ナトリウム水溶液で p H を調整し最終的に 30 m M 酢酸バッファー (p H 5.0) 溶液 40 m l とするようにした。アドリアマイシン塩酸塩 128.0 m g を加え遮光下室温で 2 日間攪拌した。透析膜 (分画分子量 = 12,000 ~ 14,000) を用いて透析し、さらに A D V A N T E C U K - 50 (分画分子量 = 50,000) の限外濾過膜で限外濾過することにより精製、濃縮し、ブロック共重合体 - 薬剤複合体医薬製剤の水溶液 16.7 m l を得た。得られた水溶液は図 15 に示す H P L C のクロマトグラムを有していた。図中①のピークはアドリアマイシンであり、②のピークはアドリアマイシンの 2 量体であり、③のブロードなピークはポリマーに結合したアドリアマイシンである。アドリアマイシン (①ピーク) の濃度は 2.99 m g / m l であり、アドリアマイシンの 2 量体 (②ピーク) の濃度は 0.27 m g / m l であった。アドリアマイシンとアドリアマイシンの 2 量体の重量比は 1 : 0.09 であった。H P L C の測定条件は実施例 3 と同一である。

応用例 1

C D F 1 メスのマウスの背側部皮下にマウス大腸癌 C o l o n 2 6 細胞を移植し、腫瘍の体積が  $100\text{ mm}^3$  前後に達した時点から実施例 3、4 または 5 で合成したブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤、またはアドリアマイシン塩酸塩を 1 日 1 回、4 日間隔、計 3 回静脈内に投与（図中、矢印で示す）し、抗腫瘍効果を検討した。各薬剤は生理食塩水に用時溶解して用いた。また投与量はすべて H P L C クロマトグラムにおける①のピークのアドリアマイシン量に換算して用いた。薬剤の抗腫瘍効果は、腫瘍増殖曲線、腫瘍消失マウス数及び化学療法係数から判定した。結果を表 1、2 と図 1 6、1 7 に示す。アドリアマイシン塩酸塩を投与した場合に比べ実施例 3～5 のブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤を投与した場合にはより幅広い投与量においてより多くの腫瘍消失マウスが観察された。特にアドリアマイシンの 2 量体の含量の多い実施例 3 の医薬製剤が完全治癒率、化学療法係数とも最も良い結果であった。

表 1 マウス大腸癌 Colon 26 に対する抗腫瘍活性

サンプル	投与量 (mg/kg)	腫瘍消失マウス
7-トリアマイシン 塩酸塩	5	0 / 5
	10	2 / 5
実施例 3 の医薬製剤	2.5	1 / 4
	5	5 / 5
	10	3 / 5
実施例 4 の医薬製剤	2.5	0 / 5
	5	1 / 5
	10	4 / 5
実施例 5 の医薬製剤	2.5	0 / 5
	5	2 / 5
	10	3 / 5

表 2 化学療法係数の比較

サンプル	LD <sub>50</sub>	Min T/C <sub>42</sub> <sup>1)</sup>	C. index <sup>2)</sup>
7-トリアマイシン 塩酸塩	15	5.95	2.52
実施例 3 の医薬製剤	15	2.59	5.78
実施例 4 の医薬製剤	15	4.88	3.08
実施例 5 の医薬製剤	15	6.02	2.49

1) 投与開始14日目におけるT/C(%)が42%以下になる最低投与量

2) 化学療法係数: LD<sub>50</sub> / (Min T/C<sub>42</sub>)

## 実施例 6

片末端メトキシ基片末端3-アミノプロピル基のポリエチレングリコール (PEG-NH<sub>2</sub>) (分子量 14,200) 20.0 g を N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) 100 ml に溶解した。その溶液に β-ベンジル-L-アスパルテート-N-カルボン酸無水物 (BLA-NCA) 15.0 g を加え、35℃の温浴上攪拌しながら24時間重合反応を行った。次いで氷浴上攪拌しながら、重合液を0.5N水酸化ナトリウム水溶液中に加え、20分間攪拌した。これに2N塩酸を加えpHをほぼ4とし、蒸留水を加え全量を20リットルに希釈した後pHを4に調整した。ホローファイバー型限外濾過装置 (アミコンCH2、限外濾過膜の分画分子量=10,000) を用いて、濃縮、水洗を繰り返した。次いで、濃縮液をスルホン酸型イオン交換樹脂 (アンバーライトIR-120B) カラムを用いて精製した。溶出液を減圧濃縮、さらに凍結乾燥して、ポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸ブロック共重合体 (PEG-P(Asp.)) 21.26 g を得た。このPEG-P(Asp.) 7.501 g をDMF 125 ml に溶解しさらにアセトニトリル 125 ml を加えた。次いで、ジシ

クロヘキシルカルボジイミド (DCC) 12.992 g を加え 5 分間攪拌後、アドリアマイシン塩酸塩 3.654<sup>EC</sup> g を DMF 250 ml に溶解しトリエチルアミン 1.14 ml を添加した溶液を加えた。次いで、室温で攪拌しながら 4 時間反応させた。反応後 1 % 磷酸水溶液 25 ml を加え 5 分間攪拌した。透析膜 (分画分子量 = 12,000 ~ 14,000) を用いて透析した後、濾過により DCC 由来の沈殿を除去した。濾液をホローファイバー型限外濾過装置 (アミコン CH2、限外濾過膜の分画分子量 = 10,000) を用いて精製し、さらに ADVANTEC UK-50 (分画分子量 = 50,000) の限外濾過膜で限外濾過することにより濃縮し、アドリアマイシン換算で 12 mg / ml (紫外分光光度計で 485 nm の吸収より算出) の水溶液 270 ml を得た。得られた PEG-P (A s p.) ADR は前記式 (2) の構造を有し、R<sub>1</sub> はメチル基、R<sub>2</sub> はトリメチレン基、R<sub>3</sub> はメチレン基、R<sub>4</sub> の一部は水酸基で残りは前記残基式 (3) [Y は CH<sub>2</sub>OH、Z は H]、R<sub>5</sub> は水素を表し、n = 325、m = 30、x = 8 である。アドリアマイシン含有率は 32.4 % であるが良好な水溶性を示した。この PEG-P (A s p.) ADR の 12 mg / ml

(アドリアマイシン換算)の水溶液 1 ml と、 $^{14}\text{C}$  標識したアドリアマイシン塩酸塩 11.93 mg を DMF 3 ml に溶解し、トリエチルアミン 4.9  $\mu\text{l}$  を添加した溶液とを混合し遮光下室温で 2 時間攪拌した。透析膜 (分画分子量 = 12,000 ~ 14,000) を用いて透析した後 ADVANTEC UK-50 (分画分子量 50,000) の限外濾過膜で限外濾過することにより精製、濃縮してブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤の水溶液 3.0 ml を得た。得られた水溶液は図 18 に示す HPLC のクロマトグラムを有していた。図中①のピークはアドリアマイシンであり、②のピークはアドリアマイシンの 2 量体であり、③のブロードなピークはポリマーに結合したアドリアマイシンである。アドリアマイシン (①ピーク) の濃度は 1.29 mg/ml であり、アドリアマイシンの 2 量体 (②ピーク) の濃度は 1.36 mg/ml であった。アドリアマイシンとアドリアマイシンの 2 量体の重量比は 1 : 1.05 であった。HPLC の測定条件は実施例 3 と同一である。

#### 実施例 7

実施例 6 で作成した PEG-P (Asp.) ADR の 12 mg/ml (アドリアマイシン換算) の水溶液 2.08 ml と、

$^{14}\text{C}$  標識したアドリアマイシン塩酸塩 9.86 mg を DMF 6.25 ml に溶解しトリエチルアミン 3.3  $\mu\text{l}$  を添加した溶液とを混合し遮光下室温で 2 時間攪拌した。透析膜（分画分子量 = 12,000 ~ 14,000）を用いて透析した後 ADVANTEC UK-50（分画分子量 = 50,000）の限外濾過膜で限外濾過することにより精製、濃縮してブロック共重合体 - 薬剤複合体医薬製剤の水溶液 2.3 ml を得た。得られた水溶液は図 19 に示す HPLC のクロマトグラムを有していた。図中①のピークはアドリアマイシンであり、②のピークはアドリアマイシンの 2 量体であり、③のブロードなピークはポリマーに結合したアドリアマイシンである。アドリアマイシン（①ピーク）の濃度は 3.41 mg/ml であり、アドリアマイシンの 2 量体（②ピーク）の濃度は 0.95 mg/ml であった。アドリアマイシンとアドリアマイシンの 2 量体の重量比は 1 : 0.28 であった。HPLC の測定条件は実施例 3 と同一である。

#### 実施例 8

片末端メトキシ基片末端 3 - アミノプロピル基のポリエチレングリコール（PEG-NH<sub>2</sub>）（分子量 14,500）

20.0 g を N, N - ジメチルホルムアミド (DMF) 100 ml に溶解した。その溶液に  $\beta$  - ベンジル - L - アスパルテート - N - カルボン酸無水物 (BLA - NCA) 15.0 g を加え、35℃の温浴上攪拌しながら24時間重合反応を行った。次いで、氷浴上攪拌しながら、重合液を0.5 N 水酸化ナトリウム水溶液中に加え、20分間攪拌した。これに2 N 塩酸を加えpHをほぼ4とし、蒸留水を加え全量を20リットルに希釈した後pHを4に調整した。ホローファイバー型限外濾過装置 (アミコンCH2、限外濾過膜の分画分子量 = 10,000) を用いて、濃縮、水洗を繰り返した。次いで、濃縮液をスルホン酸型イオン交換樹脂 (アンバーライトIR-120B) カラムを用いて精製した。溶出液を減圧濃縮、さらに凍結乾燥して、ポリエチレングリコール - ポリアスパラギン酸ブロック共重合体 (PEG - P (Asp.)) 19.01 g を得た。このPEG - P (Asp.) 5.010 g をDMF 83 ml に溶解しさらにアセトニトリル 83 ml を加えた。次いで、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) 8.693 g を加え5分間攪拌後、アドリアマイシン塩酸塩 2.445 g をDMF 167 ml に溶解しトリエチルアミン 759  $\mu$  l を添加した溶液を加えた。



次いで、室温で攪拌しながら4時間反応させた。反応後0.5% 磷酸水溶液16.7 mlを加え5分間攪拌した。透析膜（分画分子量=12,000~14,000）を用いて透析した後、濾過によりDCC由来の沈殿を除去した。濾液をADVANTEC UK-50（分画分子量=50,000）の限外濾過膜で限外濾過することにより濃縮し、アドリアマイシン換算で12 mg/ml（紫外分光光度計で485 nmの吸収より算出）の水溶液185 mlを得た。得られたPEG-P (Asp.)ADRは前記式(2)の構造を有し、R<sub>1</sub>はメチル基、R<sub>2</sub>はトリメチレン基、R<sub>3</sub>はメチレン基、R<sub>4</sub>の一部は水酸基で残りは前記残基式(3) [YはCH<sub>2</sub>OH、ZはH]、R<sub>5</sub>は水素を表し、n=350、m=32、x=8である。アドリアマイシン含有率は30.2%であるが良好な水溶性を示した。このPEG-P (Asp.)ADRの12 mg/ml（アドリアマイシン換算）の水溶液20 mlと、アドリアマイシン塩酸塩564.0 mgをDMF 60 mlに溶解しトリエチルアミン176 μlを添加した溶液とを混合し遮光下室温で2時間攪拌した。透析膜（分画分子量12,000~14,000）を用いて透析した後内液を凍結乾燥した。水に再溶解しADVANT

TEC UK-50 (分画分子量 50,000) の限外濾過膜で限外濾過することにより精製、濃縮した。さらに  $0.45\ \mu$  のフィルターを用いて濾過してブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤の水溶液  $59.4\ \text{ml}$  を得た。得られた水溶液は図 20 に示す HPLC のクロマトグラムを有していた。図中①のピークはアドリアマイシンであり、②のピークはアドリアマイシンの 2 量体であり、③のブロードなピークはポリマーに結合したアドリアマイシンである。アドリアマイシン (①ピーク) の濃度は  $1.10\ \text{mg/ml}$  であり、アドリアマイシンの 2 量体 (②ピーク) の濃度は  $3.07\ \text{mg/ml}$  であった。アドリアマイシンとアドリアマイシンの 2 量体の重量比は 1 : 2.79 であった。HPLC の測定条件は実施例 3 と同一である。

#### 実施例 9

実施例 8 で作成した PEG-P (Asp.) ADR の  $12\ \text{mg/ml}$  (アドリアマイシン換算) の水溶液  $10\ \text{ml}$  と、アドリアマイシン塩酸塩  $32.0\ \text{mg}$  を DMF  $30\ \text{ml}$  に溶解しトリエチルアミン  $10.0\ \mu\text{l}$  を添加した溶液とを混合し遮光下室温で 2 時間攪拌した。透析膜 (分画分子量 = 12,000 ~

14,000)を用いて透析した後内液を凍結乾燥した。水に再溶解しADVANTEC UK-50(分画分子量=50,000)の限外濾過膜で限外濾過することにより精製、濃縮した。さらに0.45 $\mu$ のフィルターを用いて濾過してブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤の水溶液9.1mlを得た。得られた水溶液は図21に示すHPLCのクロマトグラムを有していた。図中①のピークはアドリアマイシンであり、②のピークはアドリアマイシンの2量体であり、③のブロードなピークはポリマーに結合したアドリアマイシンである。アドリアマイシン(①ピーク)の濃度は1.98mg/mlであり、アドリアマイシンの2量体(②ピーク)の濃度は0.12mg/mlであった。アドリアマイシンとアドリアマイシンの2量体の重量比は1:0.06であった。HPLCの測定条件は実施例3と同一である。

#### 実施例10

実施例8で作成したPEG-P(Asp.)ADRの12mg/ml(アドリアマイシン換算)の水溶液5mlとアドリアマイシン塩酸塩51.4mgをDMF15mlに溶解しトリエチルアミン16.0 $\mu$ lを添加した溶液とを混合し遮光下

室温で2時間攪拌した。透析膜（分画分子量12,000～14,000）を用いて透析した後内液を凍結乾燥した。水に再溶解しADVANTEC UK-50（分画分子量50,000）の限外濾過膜で限外濾過することにより精製、濃縮した。さらに0.45 $\mu$ のフィルターを用いて濾過してブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤の水溶液15.2mlを得た。得られた水溶液は図22に示すHPLCのクロマトグラムを有していた。図中①のピークはアドリアマイシンであり、②のピークはアドリアマイシンの2量体であり、③のブロードなピークはポリマーに結合したアドリアマイシンである。アドリアマイシン（①ピーク）の濃度は1.04mg/mlであり、アドリアマイシンの2量体（②ピーク）の濃度は0.88mg/mlであった。アドリアマイシンとアドリアマイシンの2量体の重量比は1:0.85であった。HPLCの測定条件は実施例3と同一である。

#### 実施例11

実施例1（2）で作成したアドリアマイシンの2量体103.5mgとアドリアマイシン塩酸塩49.1mgをDMF65mlに溶解した溶液と、実施例8で作成したPEG-P

(A s p . ) A D R の 1 2 m g / m l ( ア ド リ ア マ イ シ ン 換 算 ) の 水 溶 液 2 3 m l と を 混 合 し 遮 光 下 室 温 で 2 時 間 攪 拌 し た 。 透 析 膜 ( 分 画 分 子 量 = 1 2 , 0 0 0 ~ 1 4 , 0 0 0 ) を 用 い て 透 析 し た 後 A D V A N T E C U K - 5 0 ( 分 画 分 子 量 = 5 0 , 0 0 0 ) の 限 外 濾 過 膜 で 限 外 濾 過 す る こ と に よ り 精 製 、 濃 縮 し た 。 さ ら に 0 . 4 5  $\mu$  の フ ィ ル タ ー を 用 い て 濾 過 し て ブ ロ ッ ク 共 重 合 体 - 薬 剤 複 合 体 医 薬 製 剤 の 水 溶 液 1 4 . 9 m l を 得 た 。 得 ら れ た 水 溶 液 は 図 2 3 に 示 す H P L C の ク ロ マ ト グ ラ ム を 有 し て い た 。 図 中 ① の ピ ーク は ア ド リ ア マ イ シ ン で あり 、 ② の ピ ーク は ア ド リ ア マ イ シ ン の 2 量 体 で あり 、 ③ の ブ ロ ード な ピ ーク は ポ リ マ ー に 結 合 し た ア ド リ ア マ イ シ ン で あ る 。 ア ド リ ア マ イ シ ン ( ① ピ ーク ) の 濃 度 は 1 . 1 3 m g / m l で あり 、 ア ド リ ア マ イ シ ン の 2 量 体 ( ② ピ ーク ) の 濃 度 は 2 . 7 6 m g / m l で あ っ た 。 ア ド リ ア マ イ シ ン と ア ド リ ア マ イ シ ン の 2 量 体 の 重 量 比 は 1 : 2 . 4 4 で あ っ た 。 H P L C の 測 定 条 件 は 実 施 例 3 と 同 一 で あ る 。

#### 実施例 1 2

実施例 8 で 作 成 し た P E G - P ( A s p . ) 1 . 0 0 3 4 g を D M F 1 6 . 7 m l に 溶 解 し さ ら に ア セ ト ニ ト リ ル 1 6 . 7

m l を加えた。ジシクロヘキシルカルボジイミド (D C C)  
1. 7 5 0 4 g を加え 5 分間攪拌後、ダウノマイシン塩酸塩  
4 7 4. 4 m g を D M F 3 3. 3 m l に溶解しトリエチルアミ  
ン 1 5 2  $\mu$  l を添加した溶液を加え、室温で 4 時間反応させた。  
反応後 0. 5 % 磷酸水溶液 3. 3 m l を加え 5 分間攪拌した。  
透析膜 (分画分子量 = 1 2, 0 0 0 ~ 1 4, 0 0 0) を用いて  
透析した後、濾過により D C C 由来の沈殿を除去した。濾液を  
A D V A N T E C U K - 5 0 (分画分子量 = 5 0, 0 0 0)  
の限外濾過膜で限外濾過することにより濃縮し、ダウノマイシ  
ン換算で 1 2 m g / m l (紫外分光光度計で 4 8 5 n m の吸収  
より算出) の水溶液 3 6 m l を得た。得られた P E G - P  
(A s p.) D A M は前記式 (2) の構造を有し、R<sub>1</sub> はメチ  
ル基、R<sub>2</sub> はトリメチレン基、R<sub>3</sub> はメチル基、R<sub>4</sub> の一部は  
水酸基で残りは前記残基式 (3) [Y は C H<sub>3</sub>、Z は H]、  
R<sub>5</sub> は水素を表し、n = 3 5 0、m = 3 2、x = 8 である。ダ  
ウノマイシン含有率は 3 0. 3 % であるが良好な水溶性を示し  
た。この P E G - P (A s p.) D A M の 1 2 m g / m l (ダ  
ウノマイシン換算) の水溶液 7 m l と、アドリアマイシン塩酸  
塩 1 7 9. 8 m g を D M F 2 1 m l に溶解しトリエチルアミン

55. 9  $\mu$  l を添加した溶液とを混合遮光下室温で2時間攪拌した。透析膜（分画分子量12,000～14,000）を用いて透析した後内液を凍結乾燥した。これを水に再溶解しADVANTEC UK-50（分画分子量=50,000）の限外濾過膜で限外濾過することにより精製、濃縮し、さらに0.45  $\mu$  のフィルターを用いて濾過してブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤の水溶液16.5 mlを得た。得られた水溶液は図24に示すHPLCのクロマトグラムを有していた。図中①のピークはアドリアマイシンであり、②のピークはアドリアマイシンの2量体であり、③のブロードなピークはポリマーに結合したダウノマイシンである。アドリアマイシン（①ピーク）の濃度は1.07 mg/mlであり、アドリアマイシンの2量体（②ピーク）の濃度は3.26 mg/mlであった。アドリアマイシンとアドリアマイシンの2量体の重量比は1:3.05であった。HPLCの測定条件は実施例3と同一である。

## 応用例 2

CDF1メスのマウスの背側部皮下にマウス大腸癌Colon 26細胞を移植し、12日後に実施例6または7で作成し

たブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤、または $^{14}\text{C}$ 標識したアドリアマイシン塩酸塩を静脈内に投与した。各薬剤は生理食塩水に用時溶解して用いた。投与後15分、1、4、24、48時間後に血液及び各種臓器を摘出した。液体シンチレーションカウンターを用いて放射能を測定することにより、血漿及び各臓器中の薬剤濃度を求めた。本実験ではアドリアマイシンとアドリアマイシンの2量体が共に $^{14}\text{C}$ 標識されている。投与した薬剤中のアドリアマイシン及びアドリアマイシンの2量体の合計量を100としたときの血漿1 ml中のアドリアマイシン及びアドリアマイシンの2量体の合計量(% of Dose / ml)の経時変化を表3に示す。単剤のアドリアマイシン塩酸塩を投与した場合、薬剤が投与後すみやかに血漿中から消失するのに対し、本発明の医薬製剤では血漿中に長時間にわたり高濃度の薬剤が滞留していた。特にアドリアマイシンの2量体の比率が高い実施例6の医薬製剤で滞留性の向上がより顕著であった。投与した薬剤中のアドリアマイシン及びアドリアマイシンの2量体の合計量を100としたときの腫瘍組織1 g中のアドリアマイシン及びアドリアマイシンの2量体の合計量(% of Dose / g)の経時変化を表4に示す。また心臓における該合計量(% of Dose / g)の経時変



化を表 5 に示す。心臓においては本発明の医薬製剤は初期濃度が単剤のアドリアマイシン塩酸塩を投与した場合に比べ若干低く経時的に減少していくのに対し、腫瘍部分には数倍の濃度の薬剤が集積し、経時的に増加していく傾向がみられた。特にアドリアマイシンの 2 量体の比率が高い実施例 6 の医薬製剤で腫瘍集積性がより顕著であった。

### 応用例 3

C D F 1 メスのマウスの背側部皮下にマウス大腸癌 C o l o n 2 6 細胞を移植し、腫瘍の体積が  $100\text{ mm}^3$  前後に達した時点から実施例 8 または 1 2 で作成したブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤、またはアドリアマイシン塩酸塩を 1 日 1 回 4 日間隔、計 3 回静脈内に投与（図中、矢印で示す）し、抗腫瘍効果を検討した。実施例 8 の医薬製剤に関しては初回の 1 回だけの投与でも検討した。各薬剤は生理食塩水に用時溶解して用いた。また投与量はすべて H P L C クロマトグラムにおける ① のピークのアドリアマイシン量に換算して用いた。薬剤の抗腫瘍効果は、腫瘍増殖曲線、腫瘍消失マウス数から判定した。結果を表 6 と図 2 5、2 6、2 7 に示す。アドリアマイシン塩酸塩を投与した場合に比べ実施例 8、1 2 の医薬製剤を投与し

た場合にはより幅広い投与量においてより多くの腫瘍消失マウスが観察された。

#### 応用例 4

C D F 1 メスのマウスの背側部皮下にマウス大腸癌 C o l o n 2 6 細胞を移植し、8 日後に実施例 8 または 9 で作成したブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤を静脈内に投与した。各薬剤は生理食塩水に用時溶解して用いた。投与後 1 5 分、1、4、2 4、4 8 時間後に血液及び各種臓器を摘出した。有機溶媒を用いて薬剤を抽出し H P L C で測定することにより血漿及び腫瘍中のアドリアマイシン及びアドリアマイシンの 2 量体の濃度を求めた。投与した薬剤中のアドリアマイシンの量を 1 0 0 としたときの血漿 1 m l 中のアドリアマイシンの量 ( % o f D o s e / m l )、投与した薬剤中のアドリアマイシンの 2 量体の量を 1 0 0 としたときの血漿 1 m l 中のアドリアマイシンの 2 量体の濃度 ( % o f D o s e / m l ) の経時変化を表 7 に示す。アドリアマイシンの 2 量体の比率が高い実施例 8 の医薬製剤では血中滞留性が著しく向上していた。投与した薬剤中のアドリアマイシンの量を 1 0 0 としたときの腫瘍組織 1 g 中のアドリアマイシンの量 ( % o f D o s e / g )

、投与した薬剤中のアドリアマイシンの2量体の量を100としたときの腫瘍組織1g中のアドリアマイシンの2量体の量（% of Dose / g）の経時変化を表8に示す。アドリアマイシンの2量体の比率が高い実施例8の医薬製剤では腫瘍集積性が著しく向上していた。

#### 応用例5

CDF1メスのマウスの背側部皮下にマウス大腸癌Colon 26細胞を移植し、11日後に実施例8、10または12で作成したブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤を静脈内投与した。各薬剤は生理食塩水に用時溶解して用いた。投与後1、24時間後に血液及び各種臓器を摘出した。有機溶媒を用いて薬剤を抽出しHPLCで測定することにより、血漿及び腫瘍中のアドリアマイシン及びアドリアマイシンの2量体の濃度を求めた。投与した薬剤中のアドリアマイシンの量を100としたときの血漿1ml中のアドリアマイシンの量（% of Dose / ml）、投与した薬剤中のアドリアマイシンの2量体の量を100としたときの血漿1ml中のアドリアマイシンの2量体の量（% of Dose / ml）の経時変化を表9に示す。実施例8の医薬製剤については応用例4とほぼ再現性

のある結果となった。アドリアマイシンの2量体の比率が実施例8の医薬製剤より低い実施例10の医薬製剤では血中滞留性がやや低くなっていた。投与した薬剤中のアドリアマイシン量を100としたときの腫瘍1g中のアドリアマイシンの量(% of Dose / g)、投与した薬剤中のアドリアマイシンの2量体の量を100としたときの腫瘍1g中のアドリアマイシンの2量体の量(% of Dose / g)の経時変化を表10に示す。実施例8の医薬製剤については応用例4とほぼ再現性のある結果が得られた。アドリアマイシンの2量体の比率が実施例8の医薬製剤より低い実施例10の医薬製剤では腫瘍集積性もやや低くなっていた。

表3      % of Dose / ml の経時変化 (血漿)

サンプル	投与後経過時間				
	15分	1時間	4時間	24時間	48時間
(A)	0.47	0.29	0.36	0.10	0.07
(B)	61.6	53.7	39.2	15.9	4.7
(C)	41.7	29.2	21.3	8.2	2.2

- (A)    アドリアマイシン塩酸塩  
 (B)    実施例6の医薬製剤  
 (C)    実施例7の医薬製剤

表 4      %   o f   D o s e / g の経時変化 (腫瘍)

サンプル	投与後経過時間				
	15分	1時間	4時間	24時間	48時間
(A)	2.3	2.4	1.7	1.3	1.0
(B)	2.3	3.8	4.9	9.6	9.1
(C)	2.3	2.7	4.9	7.0	4.0

(A)      アドリアマイシン塩酸塩

(B)      実施例6の医薬製剤

(C)      実施例7の医薬製剤

表 5      %   o f   D o s e / g の経時変化 (心臓)

サンプル	投与後経過時間				
	15分	1時間	4時間	24時間	48時間
(A)	10.5	7.0	4.6	1.1	0.5
(B)	4.9	4.2	3.3	1.6	1.0
(C)	6.5	5.4	3.8	1.4	0.7

(A)      アドリアマイシン塩酸塩

(B)      実施例6の医薬製剤

(C)      実施例7の医薬製剤

表 6 マウス大腸癌 C o l o n 26 に対する抗腫瘍活性

サンプル	投与量 (mg/kg)	腫瘍消失マウス
アドリアマイシン 塩酸塩	5	0 / 5
	10	2 / 5
実施例 8 の医薬製剤	5	5 / 5
	10 (1 回投与)	5 / 5
実施例 12 の医薬製剤	1.25	0 / 5
	2.5	0 / 5
	5	4 / 5
	10	5 / 5

表 7 % of D o s e / m l の経時変化 (血漿)

サンプル	投与後経過時間				
	15分	1時間	4時間	24時間	48時間
(A) ①	44.9	32.9	20.7	3.8	2.0
	67.2	69.7	61.9	14.2	3.9
(B) ①	27.7	12.3	5.3	1.9	0.5
	23.0	22.5	19.4	11.1	7.0

(A) 実施例 8 の医薬製剤

(B) 実施例 9 の医薬製剤

① アドリアマイシン

② アドリアマイシンの 2 量体

表 8      %   o f   D o s e / g の経時変化 (腫瘍)

サンプル		投与後経過時間				
		15分	1時間	4時間	24時間	48時間
(A)	①	4.0	3.1	6.8	19.0	20.4
	②	1.1	1.0	6.4	14.1	12.2
(B)	①	1.3	2.1	1.9	2.2	1.2
	②	0.0	8.1	2.8	3.9	4.9

(A)      実施例 8 の医薬製剤

(B)      実施例 9 の医薬製剤

①      アドリアマイシン

②      アドリアマイシンの 2 量体

表 9      %   o f   D o s e / m l の経時変化 (血漿)

サンプル		投与後経過時間	
		1時間	24時間
(A)	①	36.7	6.8
	②	83.5	17.9
(B)	①	11.0	4.1
	②	65.3	16.2
(C)	①	40.6	10.2
	②	100.2	24.5

(A)      実施例 8 の医薬製剤

(B)      実施例 10 の医薬製剤

(C)      実施例 12 の医薬製剤

①      アドリアマイシン

②      アドリアマイシンの 2 量体

表 1 0      %   o   f   D o s e / g の経時変化 (腫瘍)

サ ン プ ル	投 与 後 経 過 時 間	
	1 時 間	2 4 時 間
( A ) ①	3 . 4	2 1 . 0
②	1 . 8	1 6 . 1
( B ) ①	2 . 6	4 . 5
②	0 . 1	3 . 0
( C ) ①	5 . 0	9 . 1
②	2 . 1	6 . 3

( A )    実施例 8 の 医 薬 製 剤

( B )    実施例 1 0 の 医 薬 製 剤

( C )    実施例 1 2 の 医 薬 製 剤

①       ア ド リ ア マ イ シ ン

②       ア ド リ ア マ イ シ ン の 2 量 体

#### 発 明 の 効 果

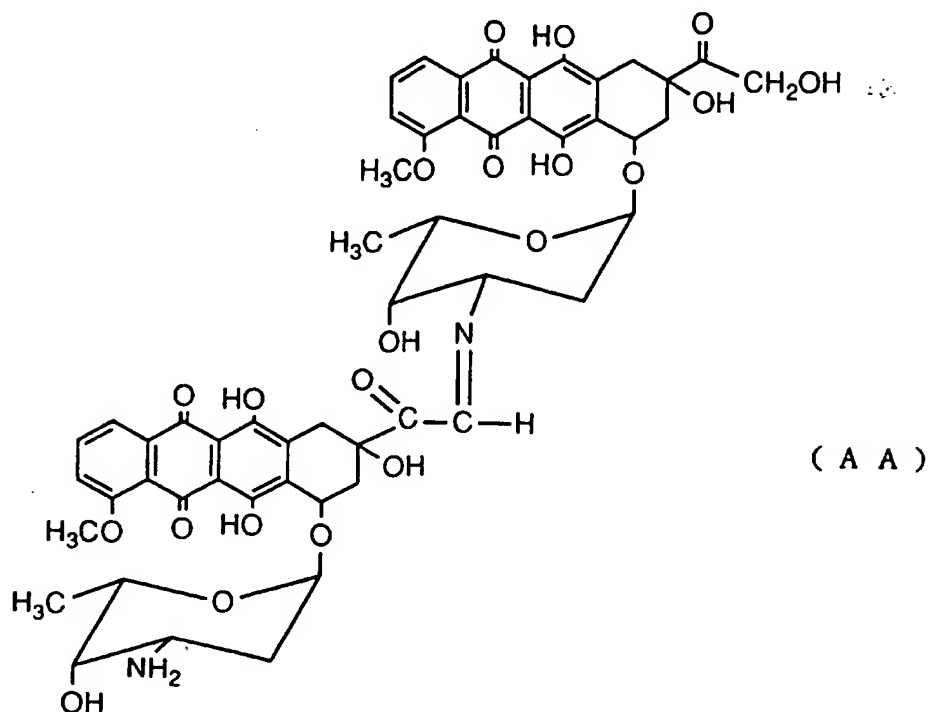
本発明の 2 , 3 又は 4 量体を含む高分子ブロック共重合体 - 薬剤複合体医薬剤は、抗癌剤等の薬剤をミセル内核に取り込ませることにより、高い薬効と低い毒性を付与することに成功



し、本発明によりきわめて有用な医薬製剤を提供できるものである。

請 求 の 範 囲

1. 抗癌活性を有するアンスラサイクリン系化合物をアルカリ処理により直接化学結合させることにより得ることができる、アンスラサイクリン系化合物の 2, 3 又は 4 量体。
2. アンスラサイクリン系化合物がアドリアマイシン、ダウノマイシン、ピラルピシン、エピルピシン及びそれらの酸塩から選ばれる 1 種以上である請求項 1 記載のアンスラサイクリン系化合物の 2, 3 又は 4 量体。
3. アドリアマイシンまたはその酸塩を、又は、アドリアマイシンまたはその酸塩とダウノマイシンまたはその酸塩をアルカリ処理により直接化学結合させることにより得ることができる、アンスラサイクリン系化合物の 2 量体。
4. アンスラサイクリン系化合物同士の結合様式がシッフベース結合である請求項 1、2 または 3 記載のアンスラサイクリン系化合物の 2, 3 又は 4 量体。
5. 下記式 (A A) の構造を有するアドリアマイシンの 2 量体。

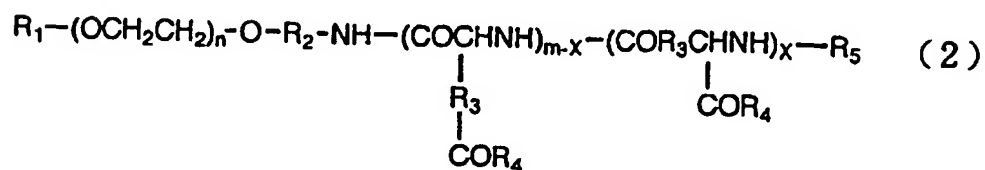
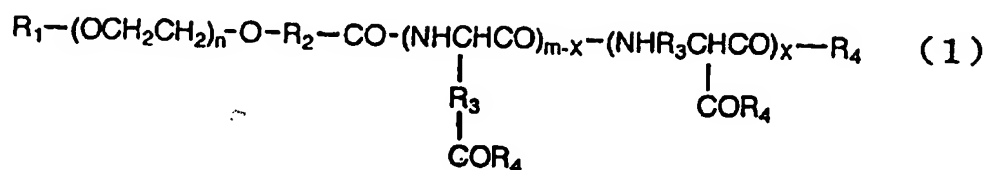


6. アドリアマイシンまたはその酸塩をアルカリ処理により直接化学結合させることにより得ることができ、図 7 に示すマスペクトルを有するアドリアマイシンの 3 量体。

7. 親水性高分子構造部分と疎水性高分子構造部分とを有する高分子ブロック共重合体が親水性部分を外殻としたミセルを形成し、疎水性の内核にアンスラサイクリン系化合物の 2, 3 又は 4 量体を、必要により他の薬剤と共に、含有することを特徴とする高分子ブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤。

8. アンスラサイクリン系化合物の 2, 3 又は 4 量体が請求項 1, 2, 3, 4, 5 又は 6 に記載のアンスラサイクリン系化合物の 2, 3 又は 4 量体である請求項 7 記載の高分子ブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤。

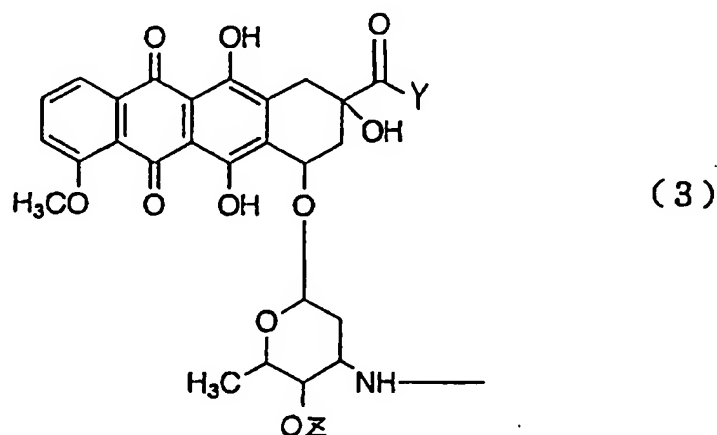
9. 高分子ブロック共重合体が下記式 (1) または (2) の構造を有する請求項 7 又は 8 記載の高分子ブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤。

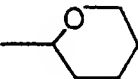


[式中、 $R_1$  は水素原子または低級アルキル基を表し、 $R_2$  は結合基を表し、 $R_3$  はメチレン基またはエチレン基を表し、 $R_4$  はそれぞれ独立して水酸基または抗癌活性を有するアンスラサイクリン系化合物の残基を表し、 $R_5$  は水素原子または保護基を表し、 $n$  は 5 ～ 1, 0 0 0、 $m$  は 2 ～ 3 0 0、 $x$  は 0 ～

300の整数を示すが、xはmより大きくないものとする。]

10. 抗癌活性を有するアンスラサイクリン系化合物の残基が、  
下記式(3)



[式中、Yは $-\text{CH}_2\text{OH}$ 又は $-\text{CH}_3$ を、ZはH又は を示す。]

で示される請求項9記載の高分子ブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤。

11. 高分子ブロック共重合体が形成するミセルの内核に、高分子ブロック共重合体に対して2~60重量%のアンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体を含む請求項7, 8, 9又は10記載の高分子ブロック共重合体-薬剤複合体医薬製剤。

12. アンスラサイクリン系化合物の2, 3又は4量体がアド

リアマイシンの 2 量体である請求項 7, 8, 9, 10又は11記載の高分子ブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤。

13. 高分子ブロック共重合体が形成するミセルの内核にアンスラサイクリン系抗癌剤とアンスラサイクリン系化合物の 2, 3又は4量体を 1 : 0.5 ~ 20の重量比で含有する請求項 7, 8, 9, 10, 11又は12記載の高分子ブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤。

14. アンスラサイクリン系抗癌剤とアンスラサイクリン系化合物の 2, 3又は4量体を 1 : 0.7 ~ 10の重量比で含有する請求項13記載の高分子ブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤。

15. アンスラサイクリン系抗癌剤とアンスラサイクリン系化合物の 2, 3又は4量体を 1 : 1 ~ 5の重量比で含有する請求項13記載の高分子ブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤。

16. アンスラサイクリン系抗癌剤がアドリアマイシン、ダウノマイシン、ピラルビシン、エピルビシン及びそれらの酸塩から選ばれる 1 種以上である請求項13, 14又は15記載の高分子ブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤。

17. 親水性高分子構造部分と疎水性高分子構造部分とを有す

る高分子ブロック共重合体が親水性部分を外殻としたミセルを形成し、疎水性の内核にアンスラサイクリン系抗癌剤を含有する高分子ブロック共重合体－薬剤複合体医薬製剤であって、これを7～9週齢のCDF1マウスに静脈内投与した場合、投与した製剤中のアンスラサイクリン系抗癌剤の量を100とした時の1時間後のマウス血漿1ml中のアンスラサイクリン系抗癌剤の量（% of Dose/ml）が10以上となる医薬製剤。

18. 1時間後のマウス血漿1ml中のアンスラサイクリン系抗癌剤の量（% of Dose/ml）が20～60となる請求項17記載の医薬製剤。

19. アンスラサイクリン系抗癌剤が、アドリアマイシン、ダウノマイシン、ピラルビシン、エピルビシン及びそれらの酸塩から選ばれる1種以上である請求項17又は18記載の医薬製剤。

20. 固形癌治療用の請求項7～19のいずれかに記載の医薬製剤。

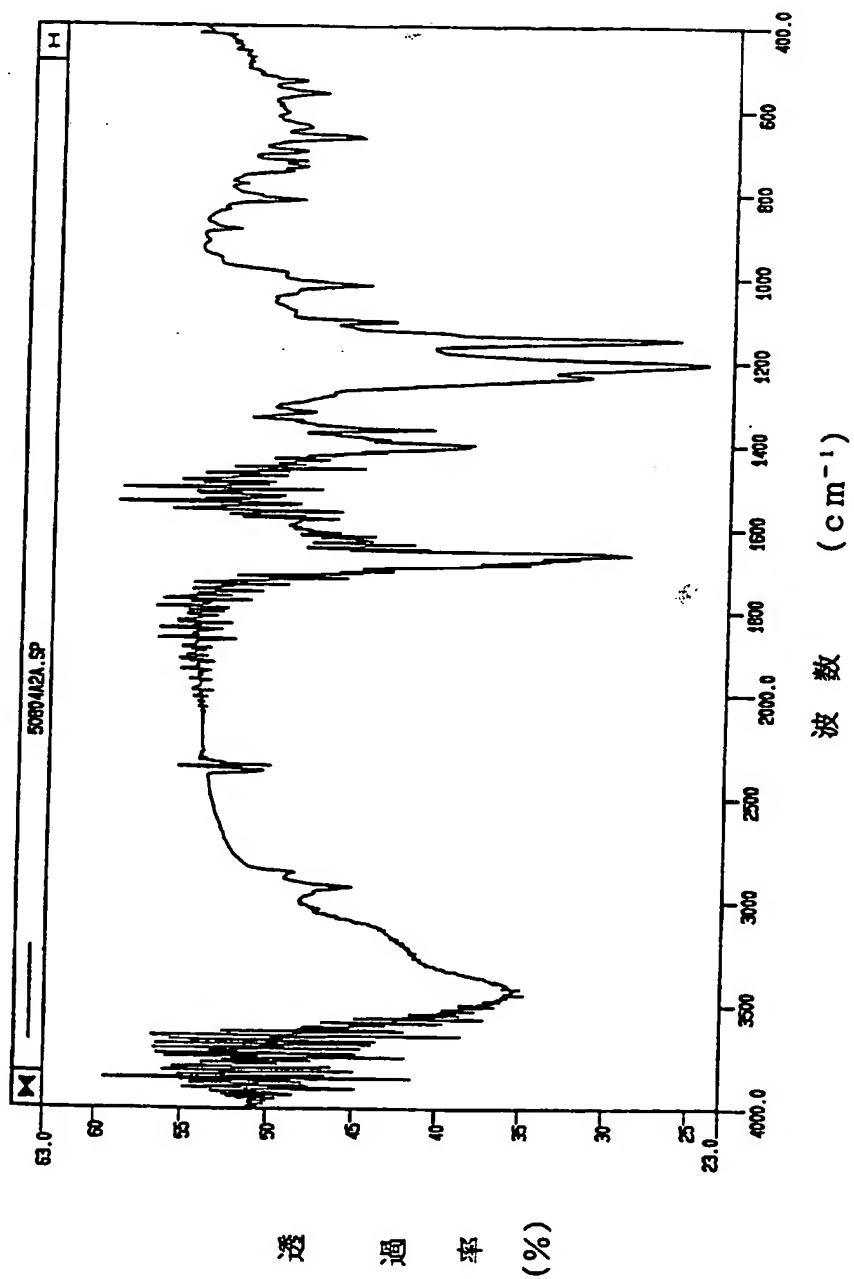


FIG. 1



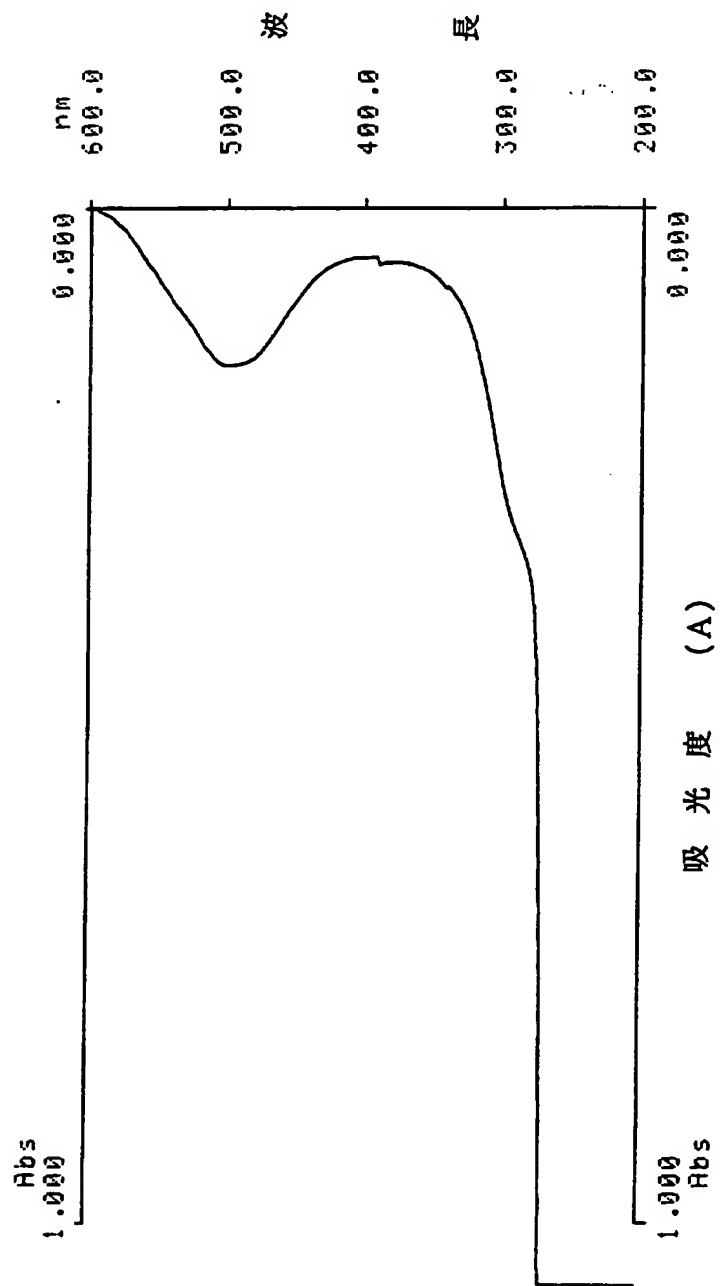


FIG. 2

3/27

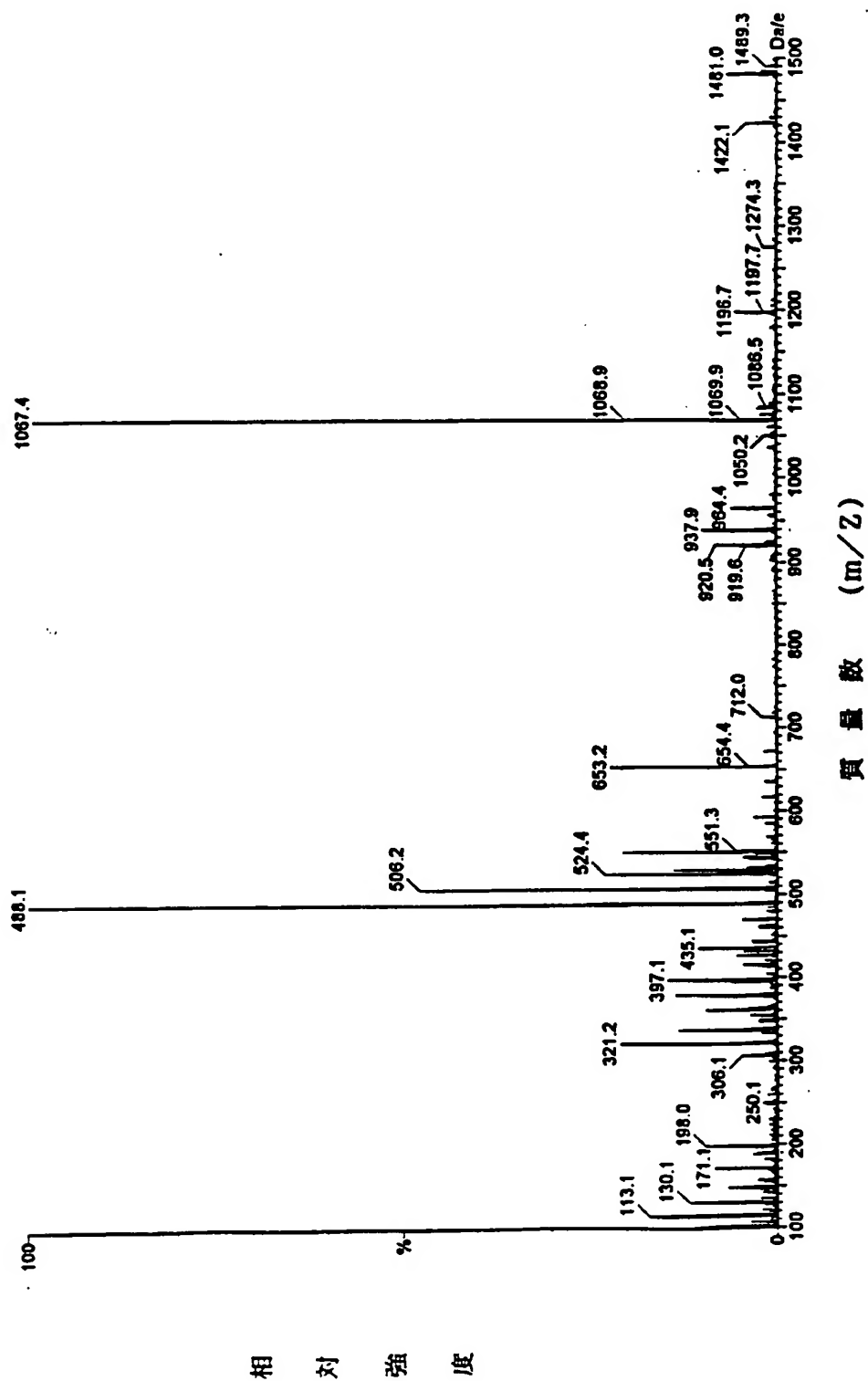


FIG. 3

4/27

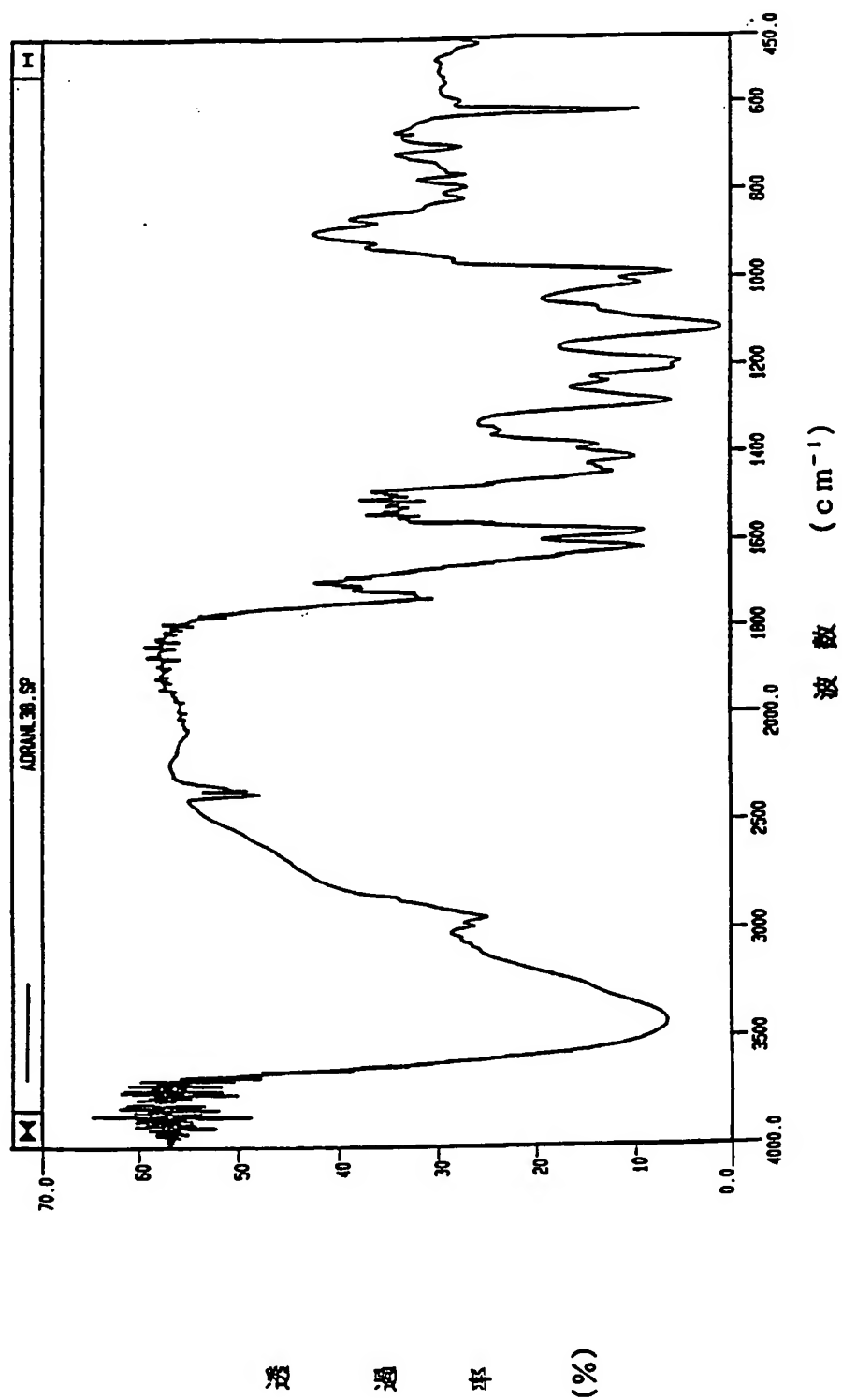


FIG. 4

5/27

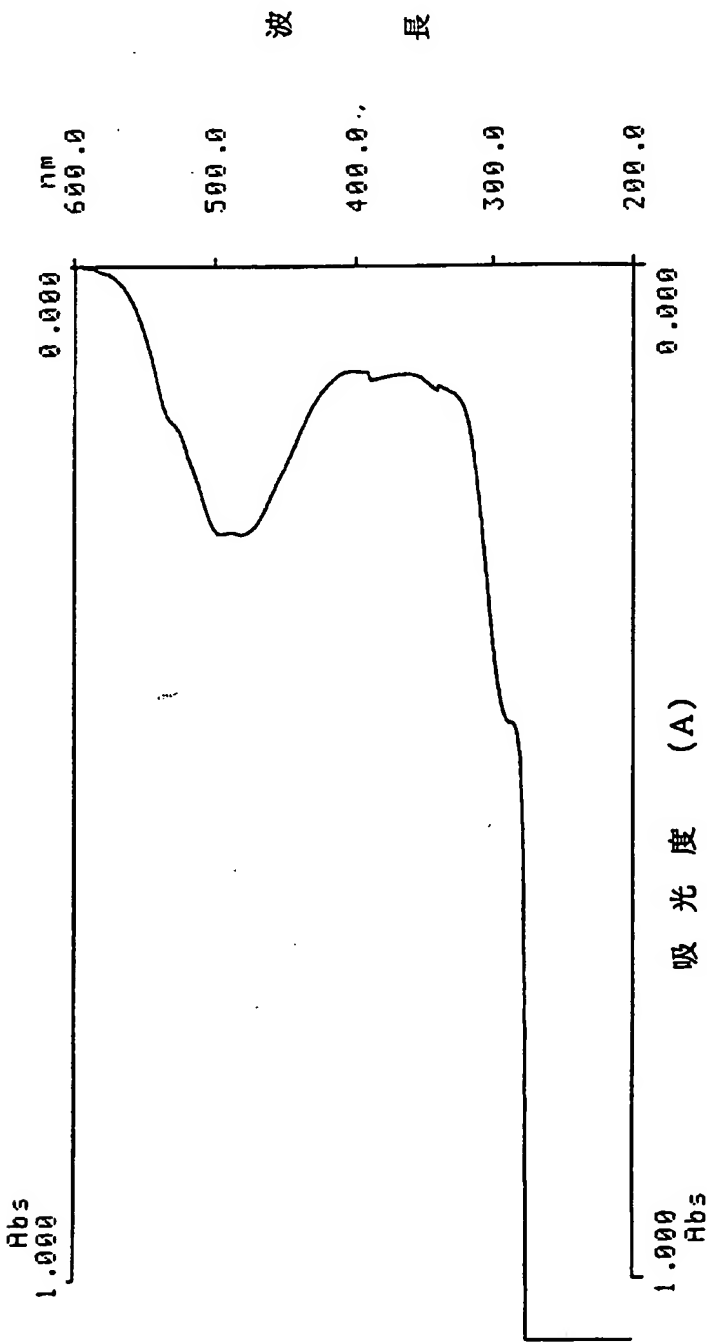


FIG. 5

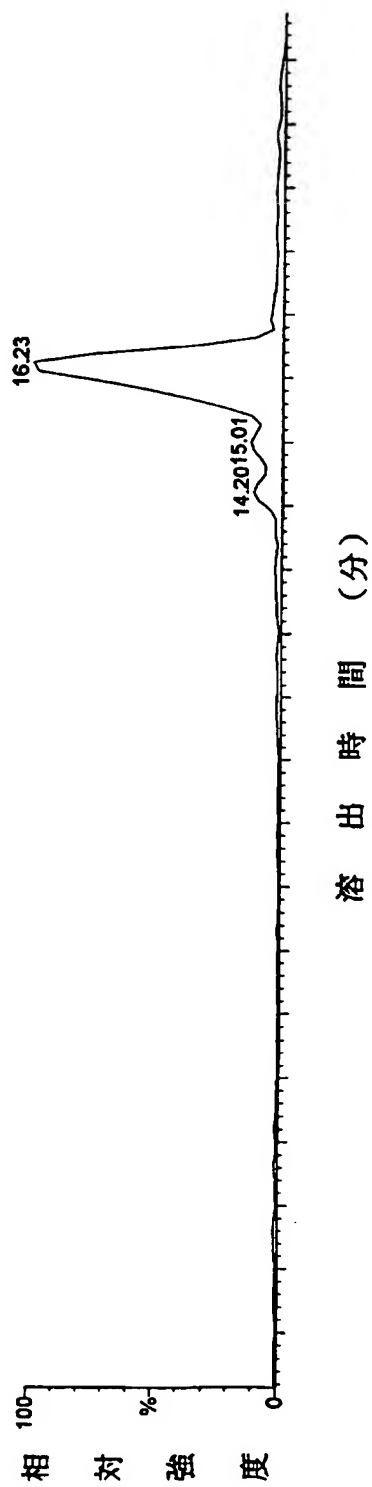
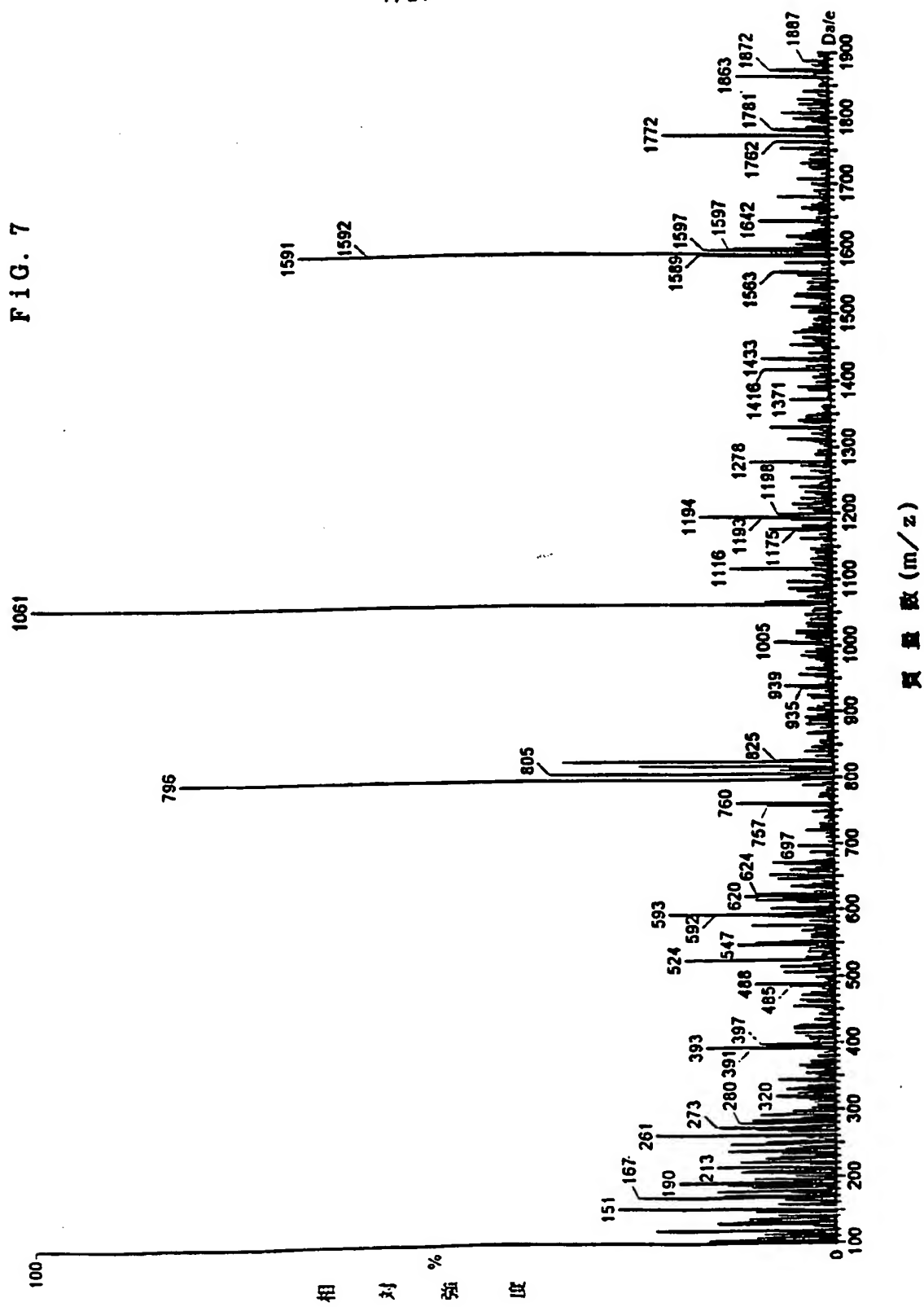
$m/z = 560$ 

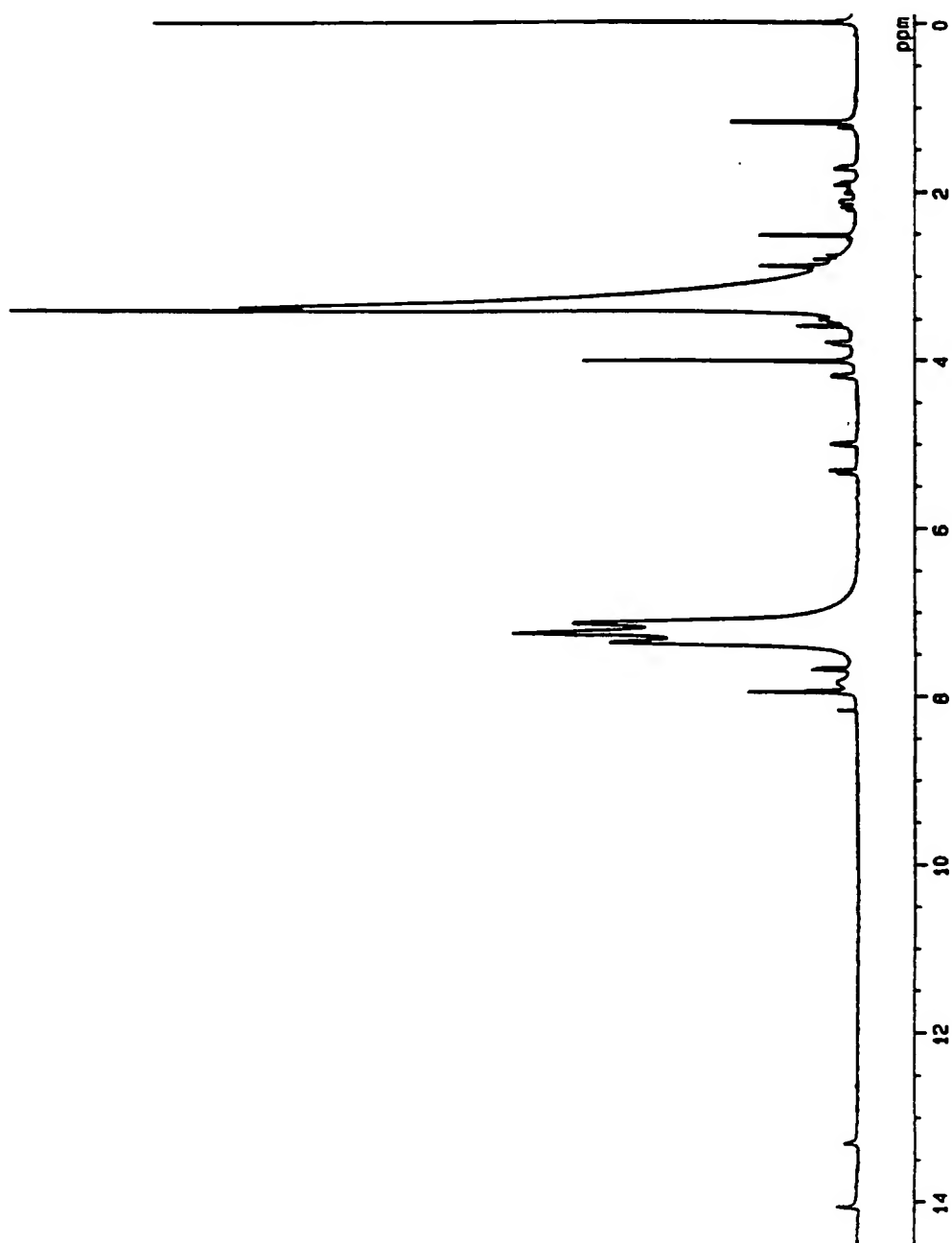
FIG. 6

7/27



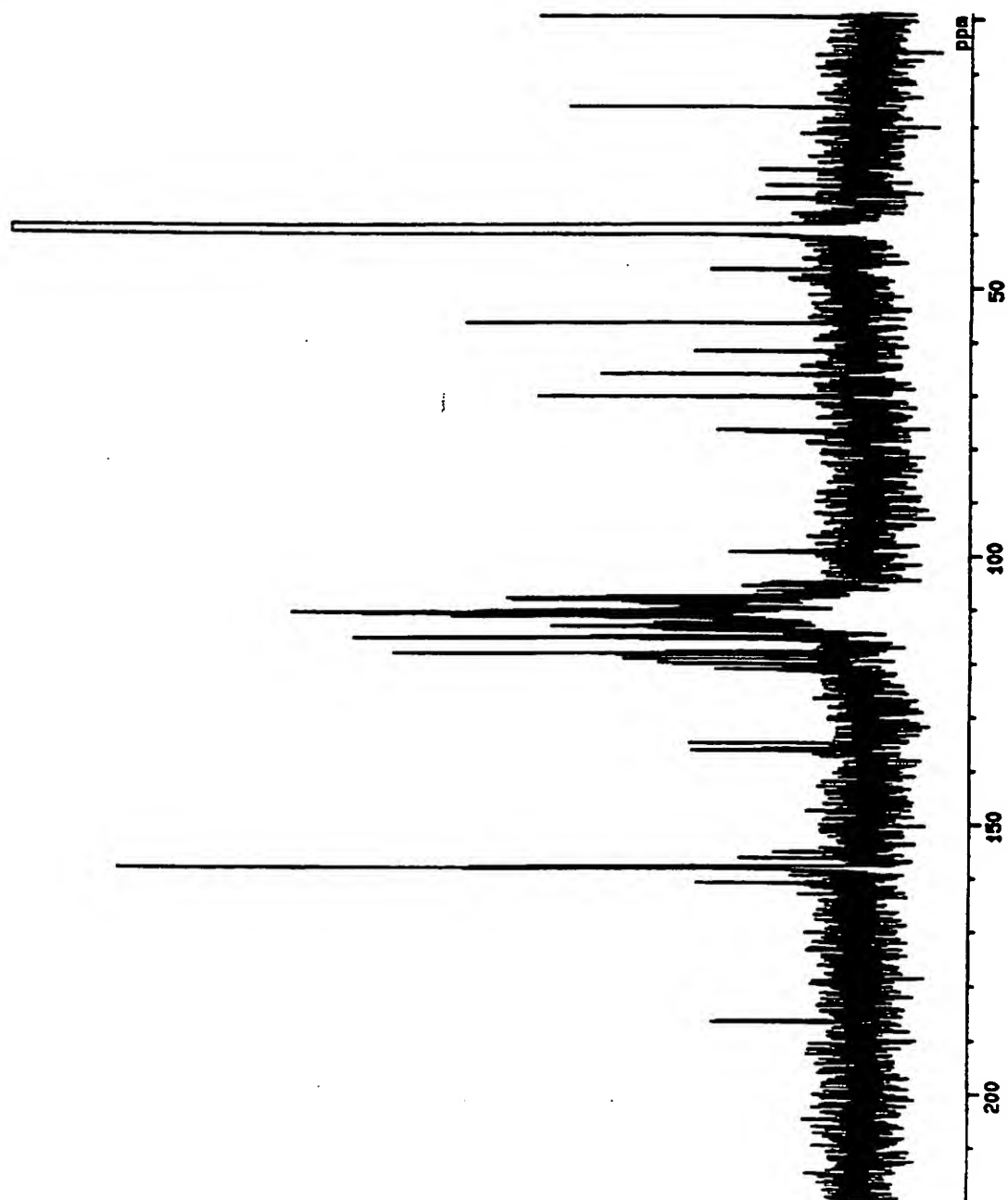
8/27

FIG. 8



9/27

FIG. 9





10/27

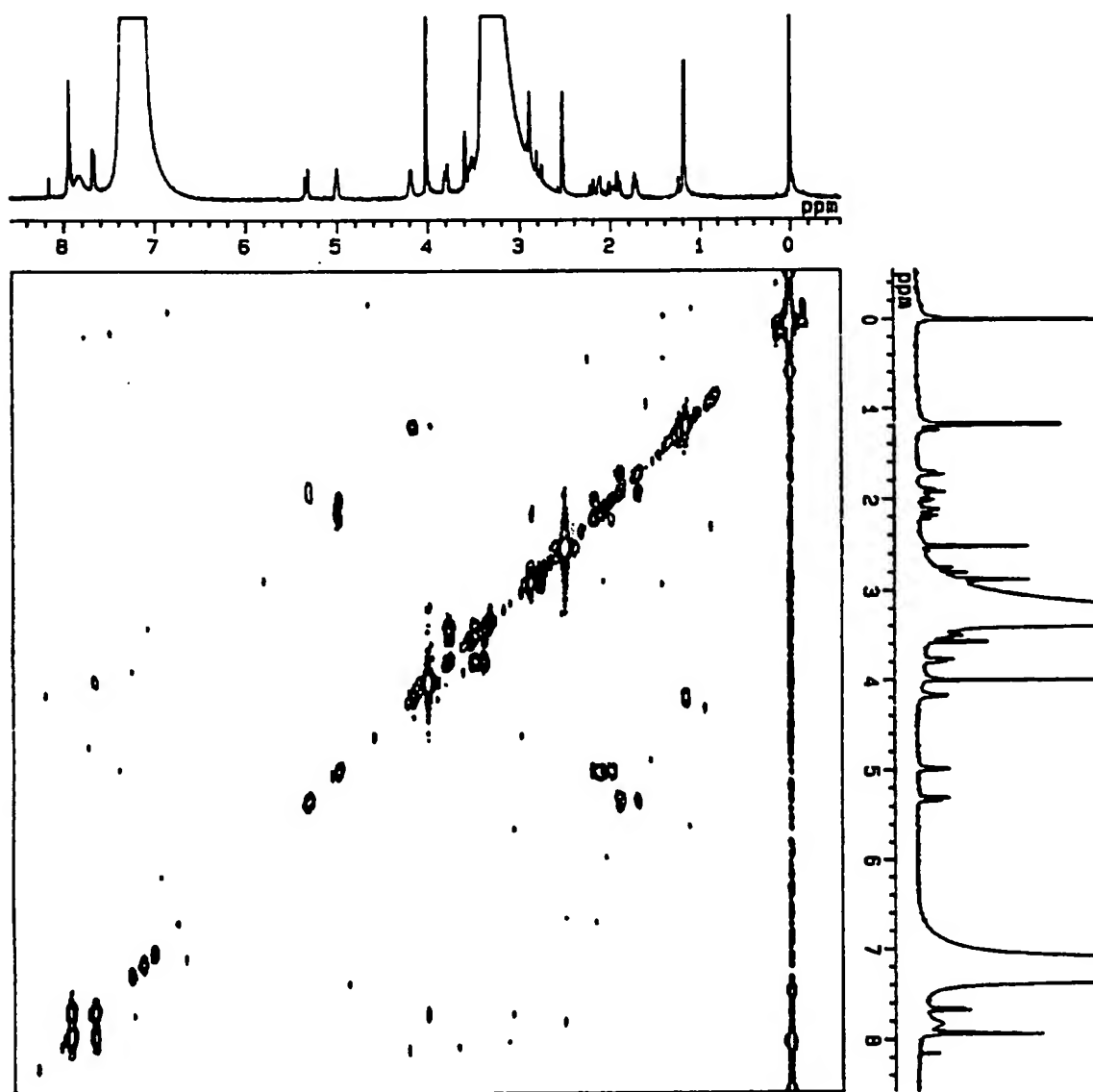


FIG. 10

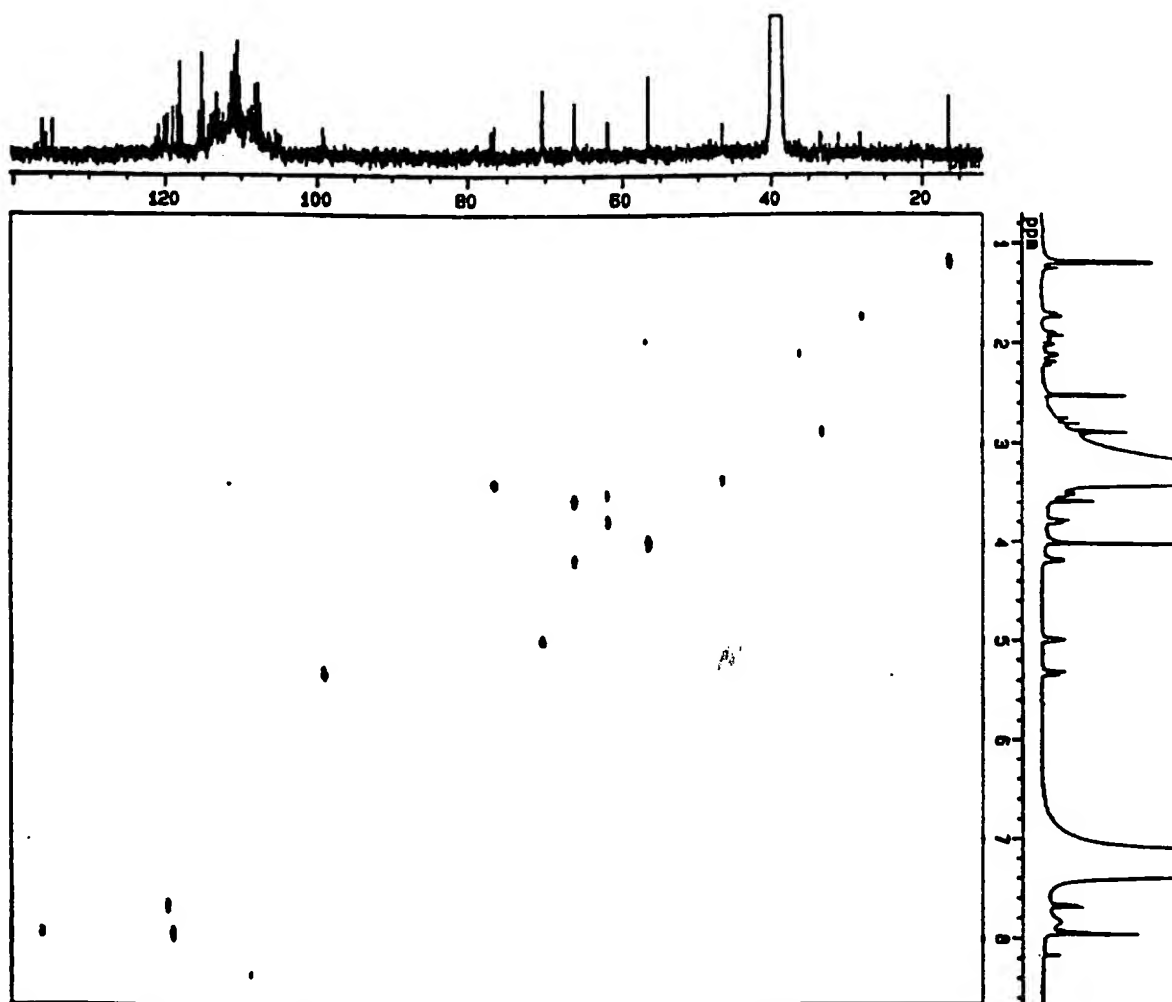
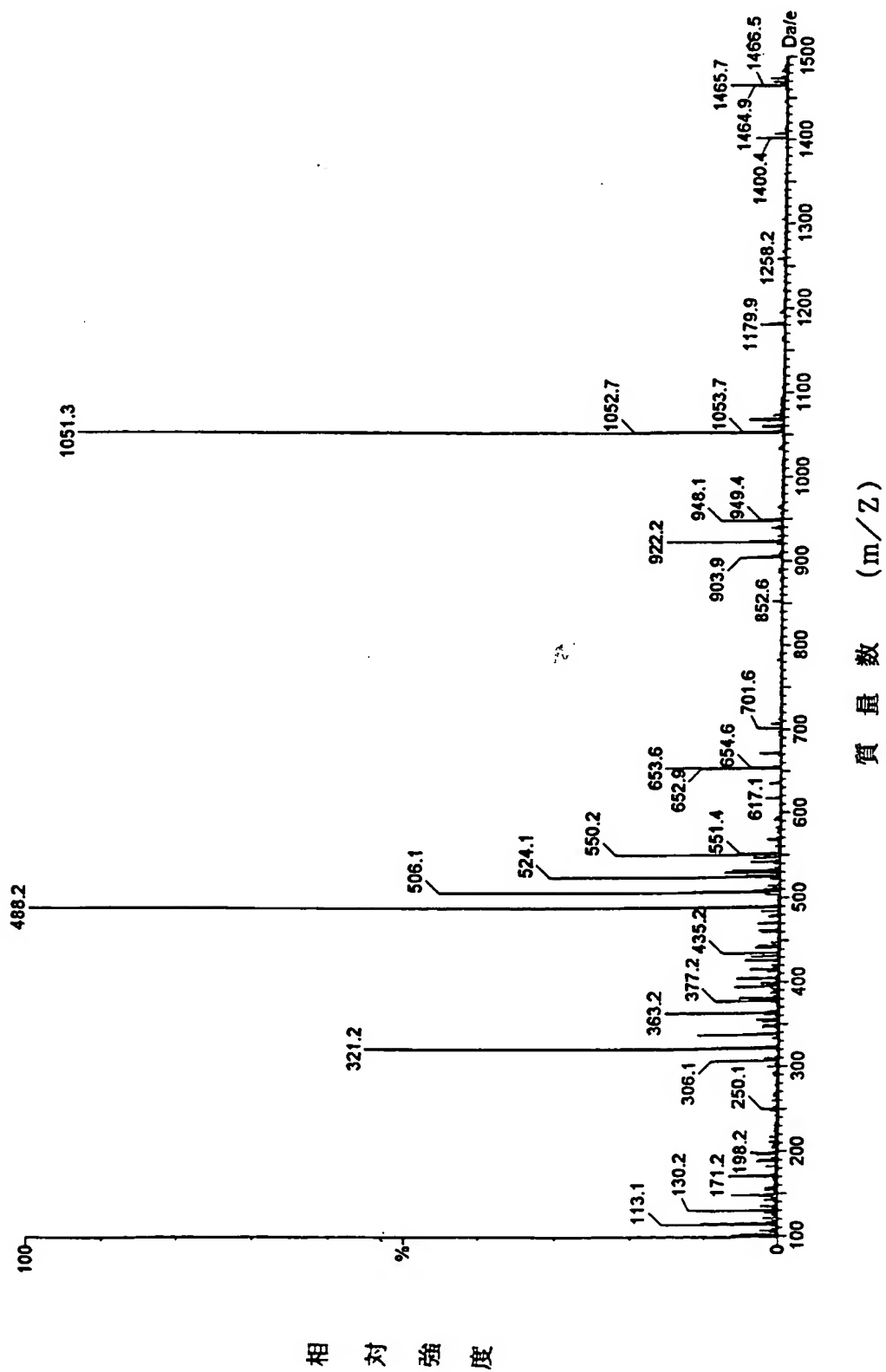


FIG. 11

FIG. 12



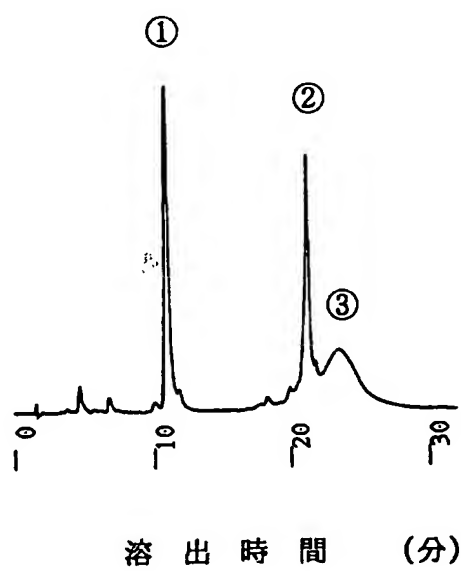


FIG. 13

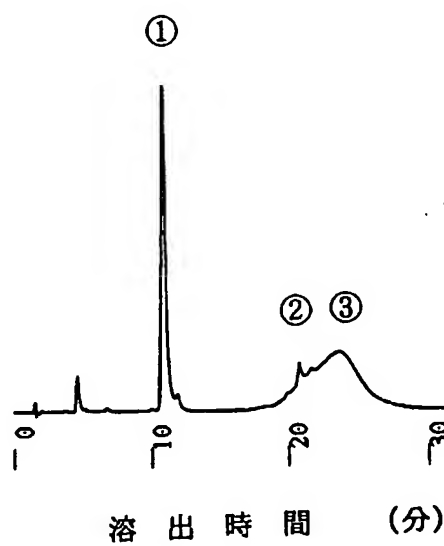


FIG. 14

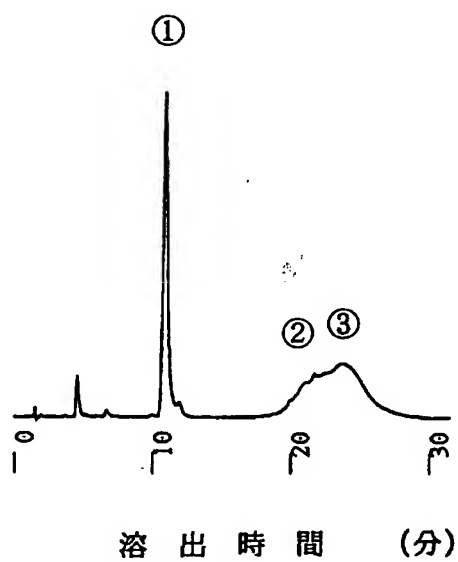


FIG. 15

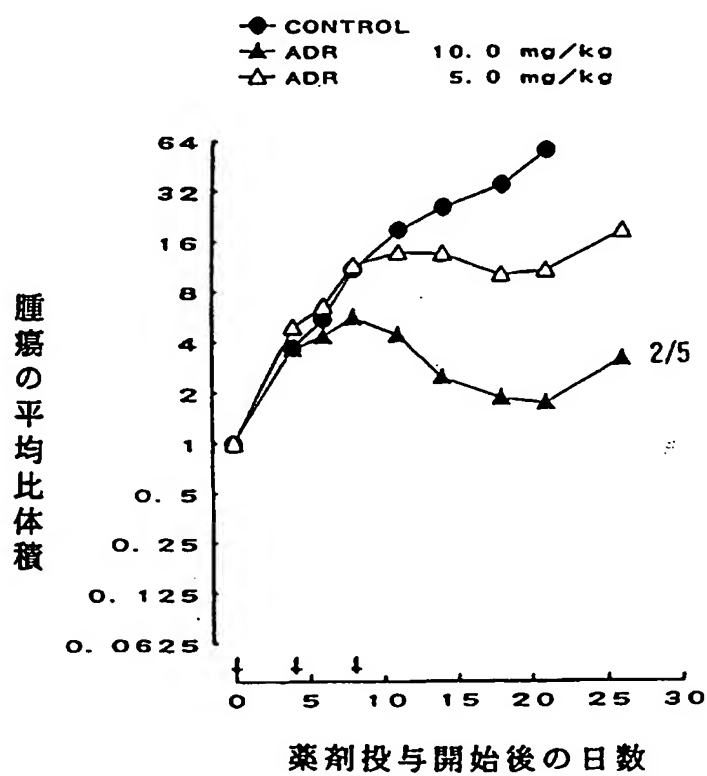


FIG. 16

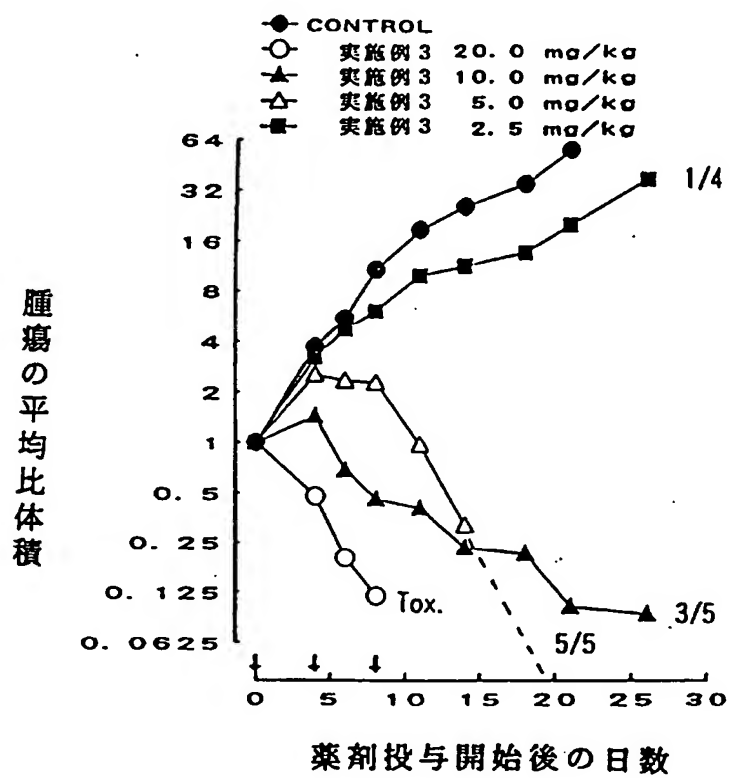


FIG. 17



## 実施例 6 の医薬製剤の H P L C クロマトグラム

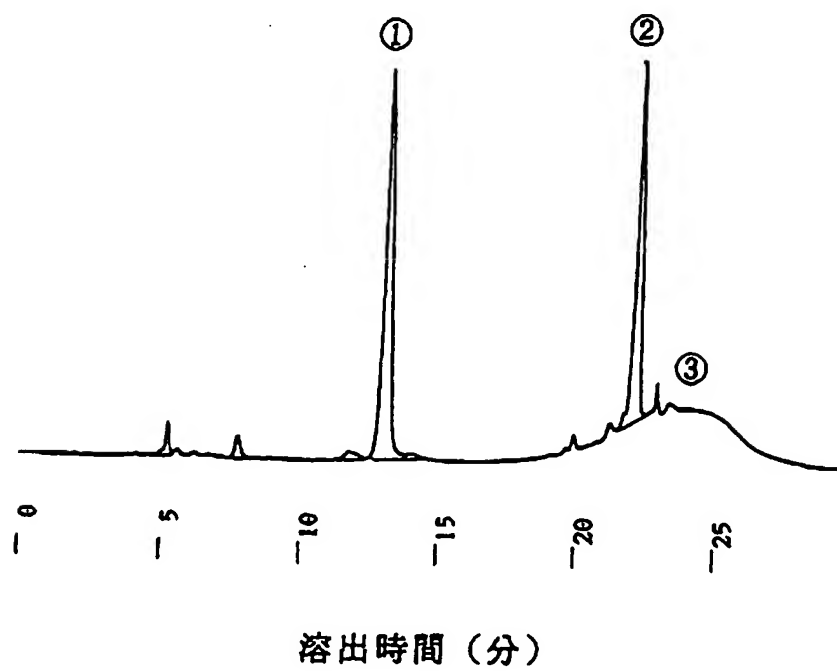


FIG. 18

## 実施例7の医薬製剤のHPLCクロマトグラム

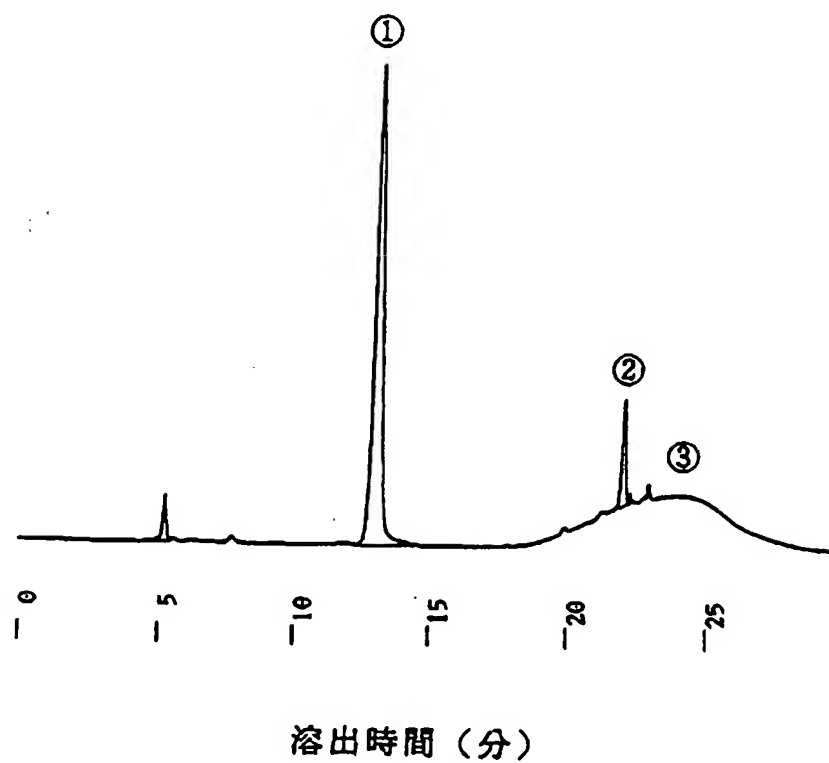


FIG. 19

## 実施例 8 の医薬製剤の HPLC クロマトグラム

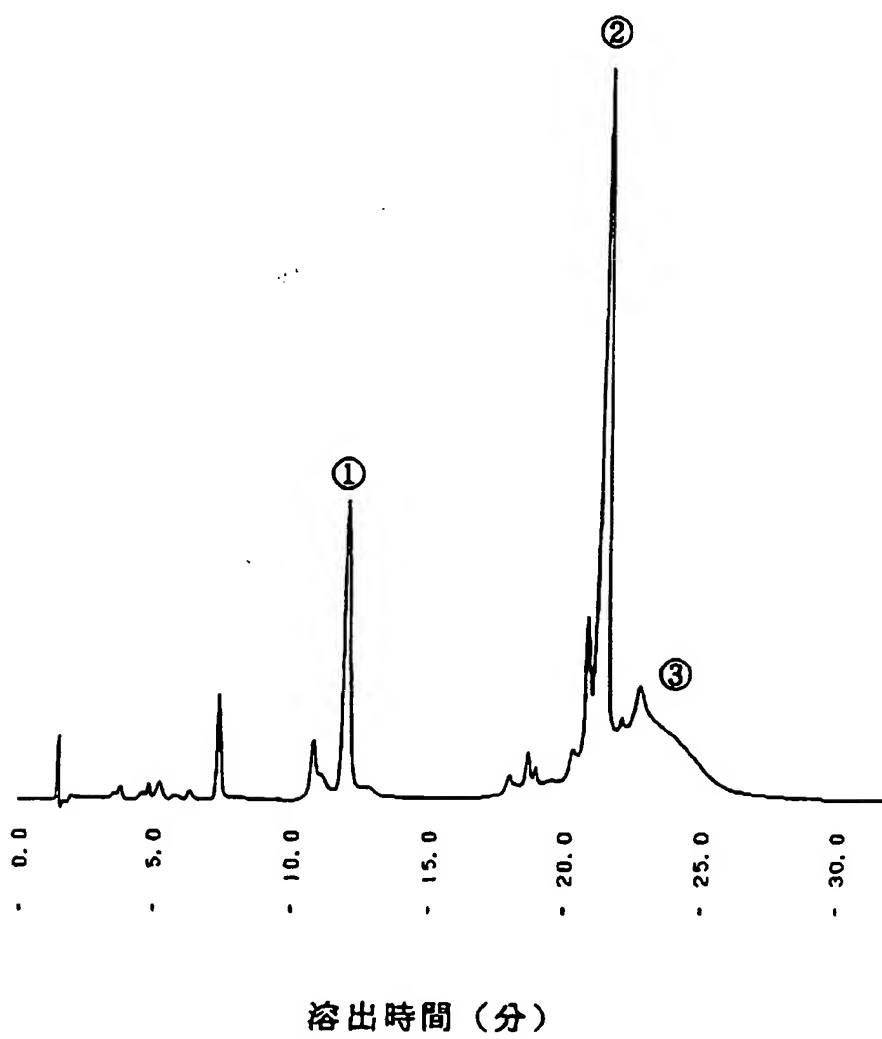
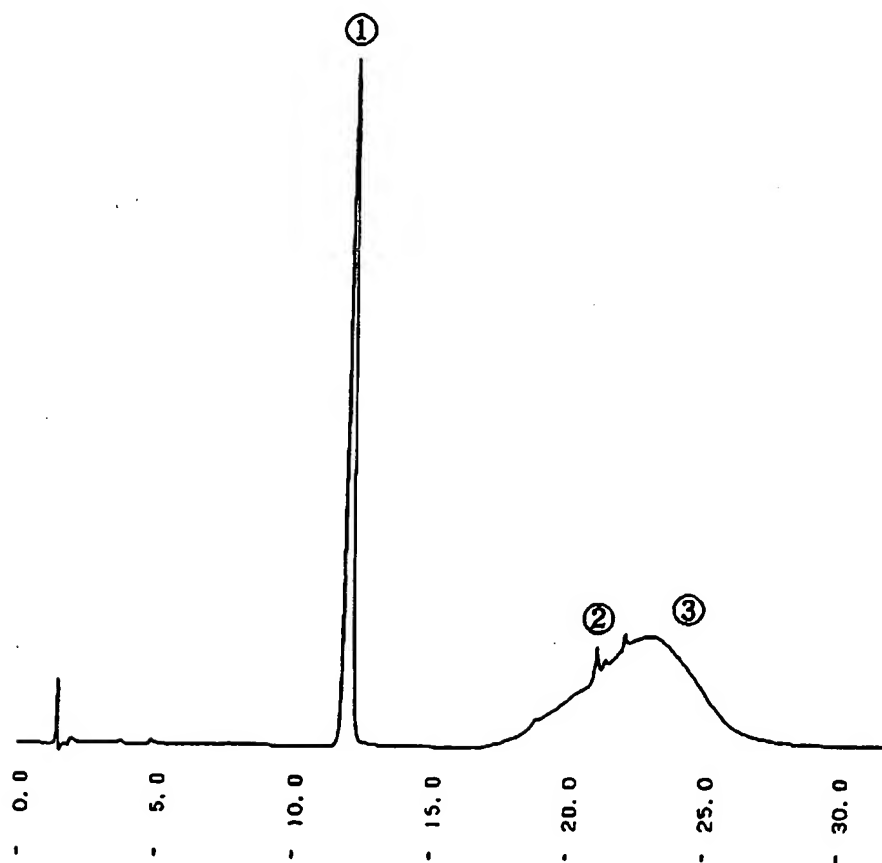


FIG. 20

## 実施例9の医薬製剤のHPLCクロマトグラム



溶出時間（分）

FIG. 21

## 実施例 10 の医薬製剤の H P L C クロマトグラム

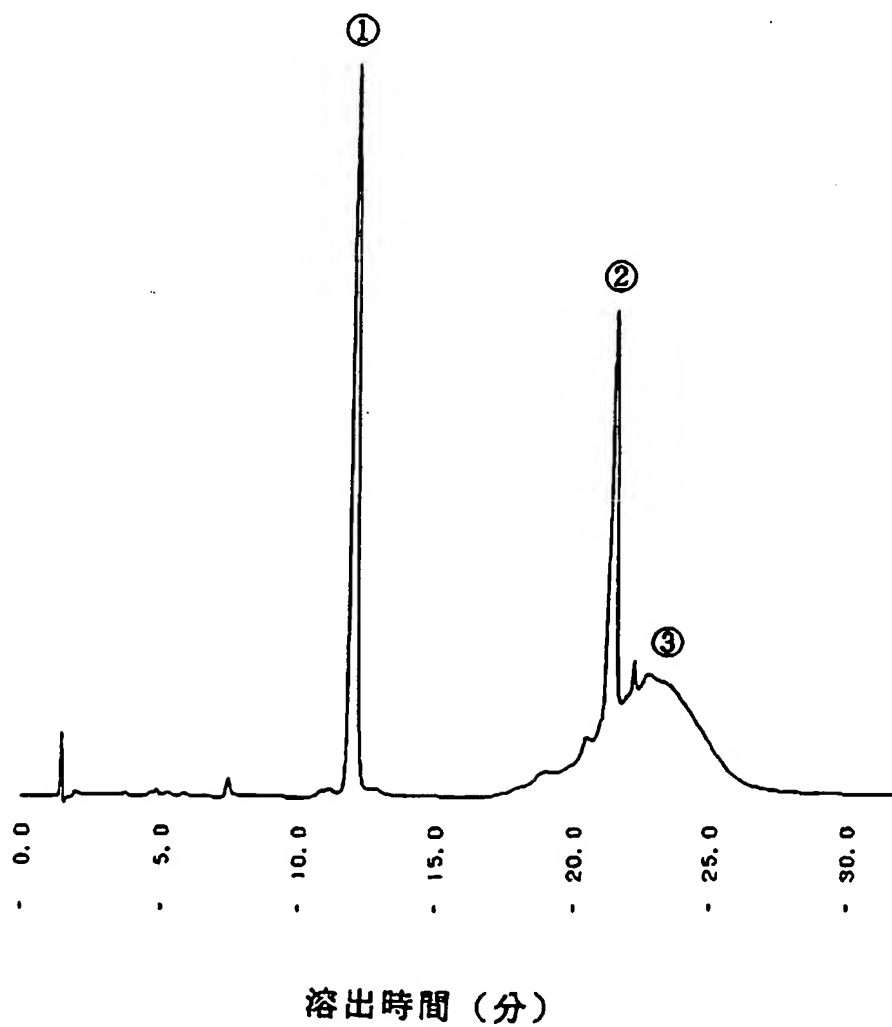
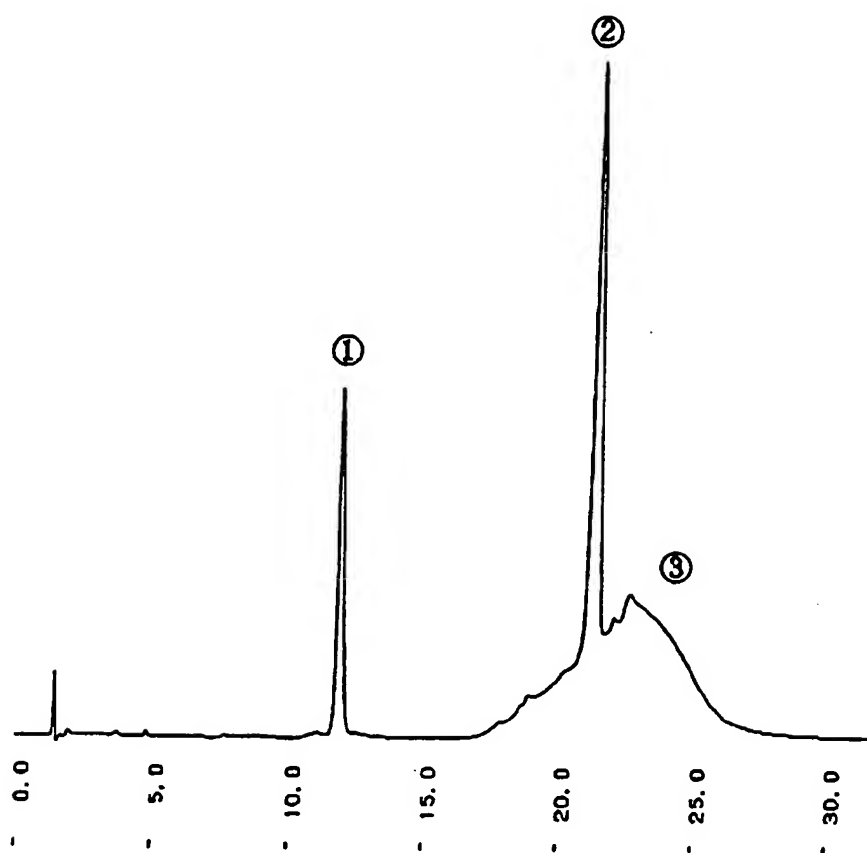


FIG. 22

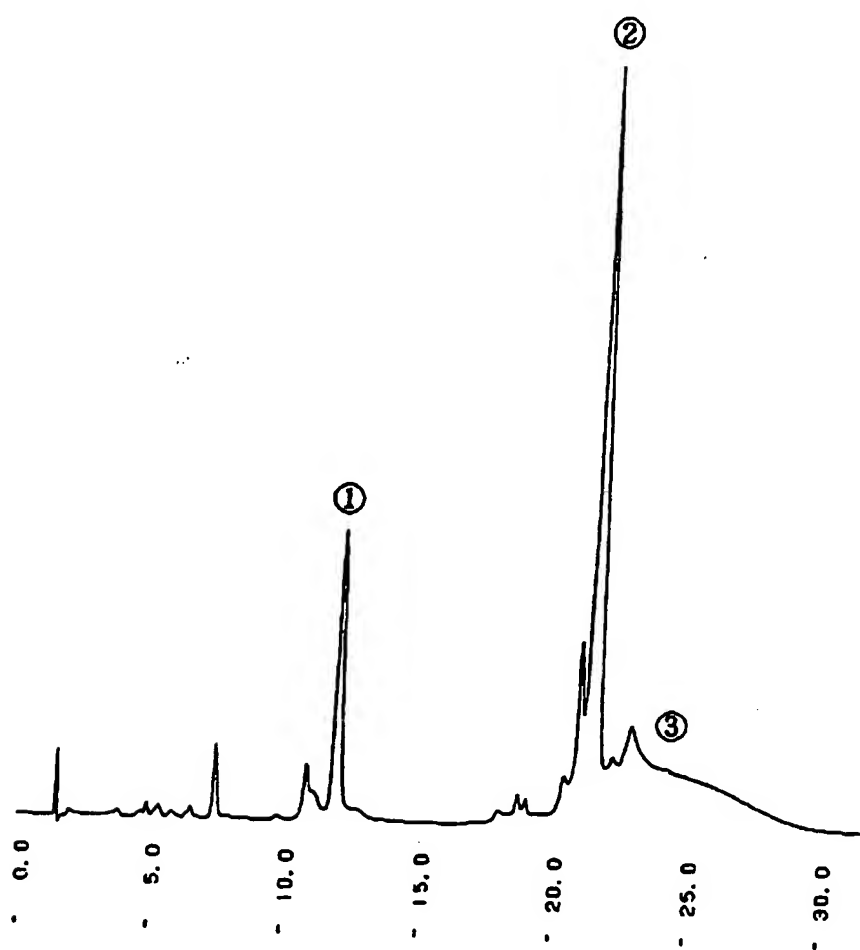
## 実施例 11 の医薬製剤の HPLC クロマトグラム



溶出時間 (分)

FIG. 23

## 実施例 12 の医薬製剤の HPLC クロマトグラム



溶出時間 (分)

FIG. 24

アドリアマイシン塩酸塩を投与した場合

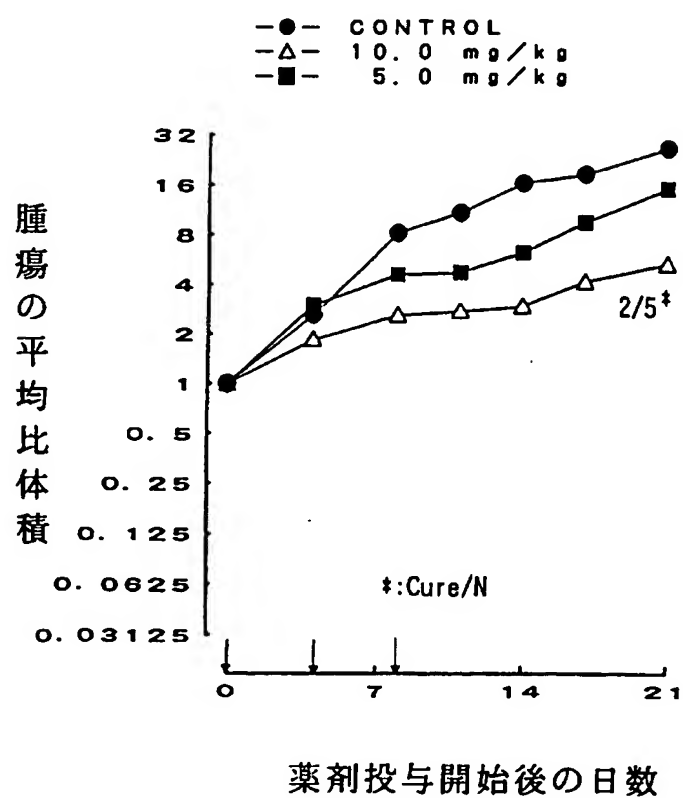


FIG. 25



## 実施例 8 の医薬製剤を投与した場合

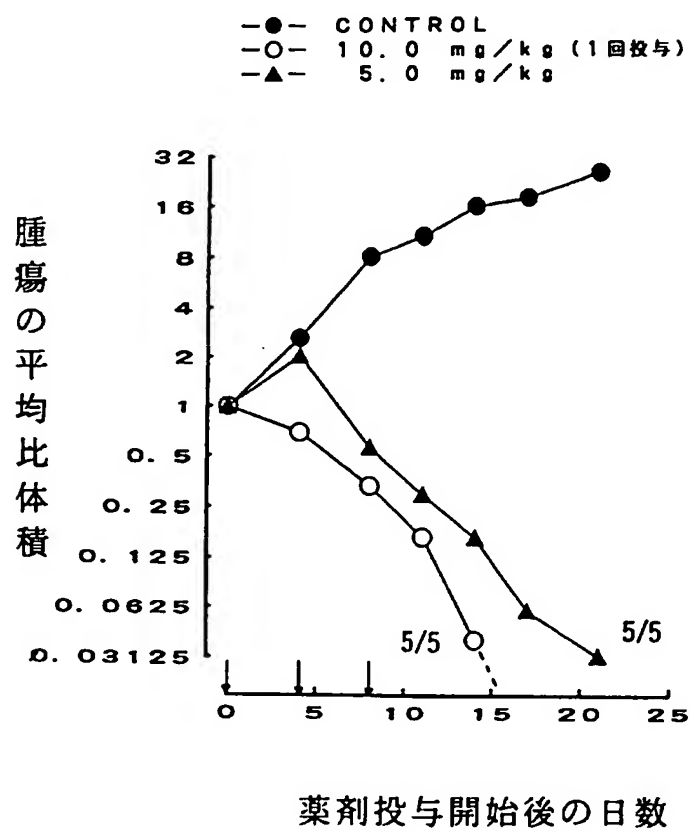


FIG. 26

実施例 12 の医薬製剤を投与した場合

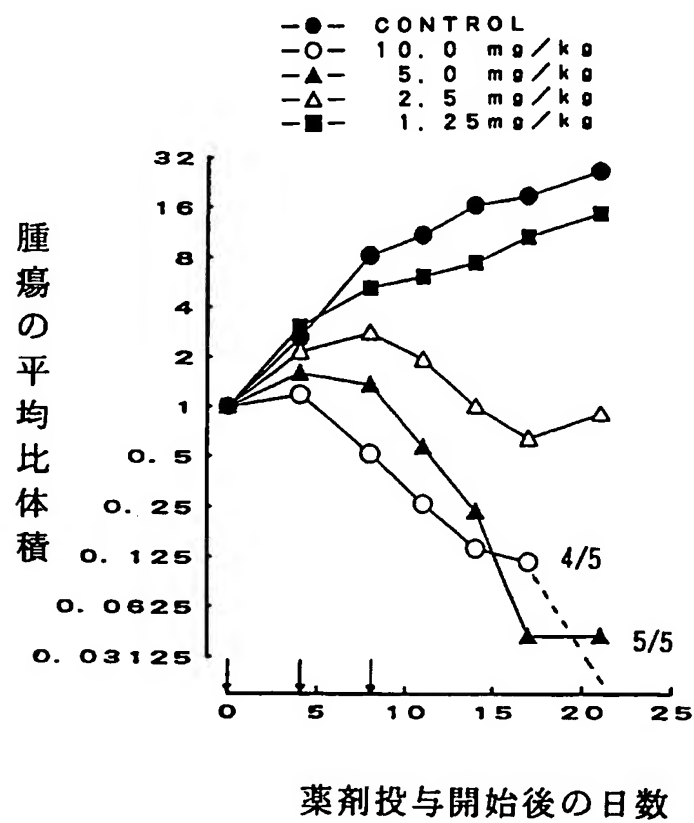


FIG. 27

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02789

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C07H15/252, A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C07H15/252, A61K31/70

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 3-5494, A (Bristol Myers Squibb Co.), January 11, 1991 (11. 01. 91), Pages 1 to 2 & EP, 398367, A	1 - 20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

December 24, 1996 (24. 12. 96)

Date of mailing of the international search report

January 14, 1997 (14. 01. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP96/02789

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int cl' C07H15/252, A61K31/70

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int cl' C07H15/252, A61K31/70

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 3-5494, A (ブリストル・マイアーズ スクイブ コムパニー) 11. 1月. 1991 (11. 01. 91) 第1-2頁 & EP, 398367, A	1-20

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 12. 96

国際調査報告の発送日

14.01.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内藤 伸一

4C

8615

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**